



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
METABOLITOS SECUNDARIOS DE EXTRACTO ETANÓLICO
DE COLCA (*Miconia pseudocentrophora*).”**

TESIS DE GRADO
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA

AUTOR: JESSICA MARIELA MENCAS PAREDES

TUTOR: DR CARLOS ESPINOZA

Riobamba – Ecuador
2015

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Dios, ya que gracias a su constante guía, protección y las bendiciones y su sabiduría que me ha dado, ha permitido que culmine una etapa más de mi vida sin presentar problemas ni adversidades sino más bien facilitando mi camino y colmando a mis alrededores de personas buenas que siempre me han brindado su amistad verdadera.

A mis padres Luis y Mariela que han sido mi apoyo en mi diario vivir apoyo emocional y compañía ha servido para que el día de hoy pueda alcanzar ese peldaño de mi vida para poder lograr ser una profesional y sacar en alto a mi familia .

A mi esposo José Luis que gracias a su amor constante a su esfuerzo y consideración incansable ha sido una ayuda incondicional en mi vida con su ejemplo de superación profesional han permitido seguir su ejemplo de surgir en la vida y tratar de alcanzar mis sueños, a mi hija María Paula que día a día a llenado de alegría mi vida por ser la razón de mi auto superación personal y profesional.

A toda mi familia que siempre ha llegado con sus consejos, palabras de aliento que han contribuido para que este sueño se haga realidad.

A mis profesores que día a día han llegado con la mejor manera de impartir sus conocimientos con la paciencia de formar jóvenes profesionales y la metodología necesaria que me ha ayudado el día de hoy poder culminar mis estudios

Jessica Mariela Mencías Paredes

AGRADECIMIENTO

Agradezco a dios por llenarme de su amor incondicional cada día, a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, por haberme dado la oportunidad de formarme en dicha institución con el aprendizaje científico y humano para así poder servir a mi país. Al Dr. Carlos Espinoza por su asesoramiento en la dirección de la presente tesis. A la Dra. Elizabeth Escudero por su valiosa colaboración en el aporte brindado en la elaboración del presente trabajo de investigación.

Jessica Mariela Mencías Paredes

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que el trabajo de investigación: “SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE EXTRACTO ETANOLICO DE COLCA (*Miconia pseudocentrophora*)”, de responsabilidad de la señorita Jessica Mariela Mencías Paredes, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dra. Nancy Veloz DECANO FAC. CIENCIAS	-----	-----
Dra. Ana Karina Albuja DIRECTOR ESCUELA BIOQUÍMICA Y FARMACIA	-----	-----
Dr. Carlos Espinoza DIRECTOR DE TESIS	-----	-----
Dr. Jacinto Mera MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	-----
Abg. Bertha Quintanilla DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	-----	-----
NOTA DE TESIS		-----

Yo, Jessica Mariela Mencías Paredes, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

JESSICA MARIELA MENCÍAS PAREDES

RESUMEN

Se realizó la separación, purificación e identificación de metabolitos secundarios del extracto etanólico de Colca (*Miconia pseudocentrophora*), la muestra recolectada en el bosque de San Francisco de Guallabamba del cantón Chambo. Para obtener el extracto se realizó: limpieza del vegetal fresco, fragmentación y licuado con etanol, reposo por 72 horas, filtración; el filtrado se evapora a presión reducida y elimina las clorofilas por refrigeración. Los resultados obtenidos son: líquido en su aspecto, de color marrón, sabor amargo del vegetal joven, olor endulzante, pH es de 3.43, densidad siendo de 0.97 g/ml; contiene flavonoides, terpenos. El fraccionamiento de 10 mL en columna de silica gel de fracciones de Hexano y Hexano: Acetato, se obtienen derivados terpenicos sólidos ligeramente coloreados de amarillo que dan bandas de 418nm y son posibles saponinas, las mismas que se corren en Cloroformo: Metanol : Agua (64:30:10), se revelan con vainillina, de las fracciones eluidas con Acetato de etilo: Metanol y Metanol puro se obtienen los posibles flavonoides, los mismos que dan de 4 a 5 bandas y que están entre 418 y 534nm, la cromatografía tienen un Rf:0.87, se corrió en de Acetato de etilo: Ácido fórmico: Ácido acético: Agua(100:11:11:26) , el color se intensifica con vapores de amoniacio y se observa al revelar con el sulfato de cerio los colores amarillos intensos. Los compuestos que tienen una sola banda pueden ser terpenos, y los compuestos que tienen de tres a cinco bandas pueden ser flavonoides, sus estructuras deben ser identificadas mediante espectroscopia de masas. De acuerdo a los análisis realizados se recomienda utilizar esta planta en la industria farmacéutica para la elaboración de medicamentos.

SUMMARY

It has been carried out Separation, purification and identification of secondary metabolites from ethanolic extract of Colca (*Miconia pseudocentrophora*), the sample was collected in the forest of “San Francisco de Guallabamba” Canton Chambo. To obtain the extract it was performed: cleaning fresh vegetable, fragmentation and blend with ethanol, rest for 72 hours, filtration; the filtrate evaporated under reduced pressure and removes chlorophylls by means of cooling The results are: liquid in appearance, brown, bitter taste of young vegetable, sweetener odor, its pH is 3.43, density 0.97g/ml; it contains terpene flavonoids. Fractionation of 10 mL in column of silica gel of Hexane and Hexane fractions: Acetate, terpenes colored slightly yellow solid are obtained giving bands of 418nm and these are possible saponins, which are passed through chloroform: Methanol water (64.30:10), are developed with vanillin, the fractions eluted with ethyl acetate: Methanol and pure Methanol is obtained possible flavonoids, obtaining 4 to 5 bands which are between 418 and 534nm, chromatography has Rf: 0.87, it was passed through ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water (100:11:11:26), the color intensifies with ammonia vapors and intense yellow colors are observed when developing with cerium sulfate. Compounds that possess a single band may be terpenes, and the compounds having from three to five bands may be flavonoids, their structures must be identified by mass spectroscopy. According to the analysis performed it is recommend to use this plant in the pharmaceutical industry for drug development.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celcius
Bu(OH)	Butanol
cm	centímetros
Ce SO₄	Sulfato de cerio
Et(OH)	Etanol
EtOAc	Acetato de etilo
g	Gramos
L	litro
Me(OH)	Metanol
m	Metros
mm	Milímetros
mg	Miligramos
mg/ mL	Miligramo por litro
min	Minutos
mL	Mililitros
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	Partes por Millón
P/V	Peso por volumen
rpm	Revoluciones por minuto
V/V	Volumen por volumen
nm	Nanometros
µg	Microgramos
UV	Ultravioleta
TLC	Cromatografía de capa fina
CC	Columna cromatográfica
λ	Longitud de onda
ABS	Absorbancia

INDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
1. MARCO TEÓRICO	- 1 -
1.1 Plantas medicinales	- 1 -
1.2 Principio activo	- 1 -
1.3 Metabolitos secundarios.....	- 2 -
1.4 Fitocomplejo	- 3 -
1.5 Muestra	- 4 -
1.6 Extracto vegetal	- 4 -
1.6.1 <i>Extracto vegetal fluido:</i>	- 4 -
1.6.2 <i>Extracto vegetal blando:</i>	- 4 -
1.6.3 <i>Extracto seco:</i>	- 4 -
1.7 Lugar de recolección	- 5 -
1.8 Identificación botánica	- 5 -
1.9 Proceso de muestreo	- 5 -
1.10 Proceso de extracción	- 5 -
1.11 Colca (<i>Miconia pseudocentrophora</i>):.....	- 5 -
1.11.1 <i>Taxonomía</i>	- 5 -
1.11.3 <i>Descripción botánica</i>	- 6 -
1.11.4 <i>Aplicaciones y usos</i>	- 7 -
1.11.5 <i>Composición química</i>	- 7 -
1.12 Métodos de extracción.....	- 8 -
1.13 Maceración.....	- 9 -
1.14 Análisis fitoquímico	- 9 -
1.15 Tamizaje fitoquímico	- 9 -
1.16 Cromatografía	- 10 -
1.16.3 <i>Cromatografía en capa fina (CCF)</i>	- 14 -
1.16.3.1 <i>Adsorbentes más comunes para cromatografía en capa fina</i>	- 15 -
1.16.4 <i>Cromatografía de capa fina preparativa</i>	- 15 -
1.16.7 <i>Cromatografía en placa preparativa</i>	- 17 -
1.16.8 <i>Cromatografía de columna</i>	- 18 -
1.16.8.1 <i>Procedimiento</i>	- 18 -
2. DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN.....	- 21 -
2.1 Lugar de la investigación.....	- 21 -
2.2 Recursos materiales.....	- 21 -
2.2.1 <i>Recolección del vegetal</i>	- 21 -
2.3 Comprobación taxonómica e identificación botánica.	- 21 -
2.4 Procesamiento de la materia prima.	- 21 -

2.5	Preparación del extracto	- 22 -
2.5.1	<i>Procedimiento</i>	- 22 -
2.6	Evaluación de propiedades físicas y químicas del extracto etanólico.	- 22 -
2.6.1	<i>Determinación de los requisitos organolépticos</i>	- 22 -
2.6.2	<i>Determinación de los requisitos físicos</i>	- 23 -
2.7	Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico (a)	- 24 -
2.7.1	<i>Ensayo de baljed</i>	- 24 -
2.7.2	<i>Ensayo de borntrager</i>	- 24 -
2.7.3	<i>Ensayo de espuma</i>	- 24 -
2.7.4	<i>Ensayo del cloruro férrico</i>	- 25 -
2.7.5	<i>Ensayo de shidona</i>	- 25 -
2.7.6	<i>Ensayo de dragendorff</i>	- 25 -
2.8	Separación y purificación de metabolitos del extracto de colca.	- 26 -
2.9	Separación y purificación del extracto etanólico.....	- 26 -
2.9.1	<i>Separación del extracto etanólico en columna.</i>	- 26 -
2.9.2	<i>Determinación cromatográfica de las fracciones de columna.</i>	- 27 -
2.14.2	<i>Determinación cromatográfica de las fracciones de columna.</i>	- 33 -
2.15.2	<i>Determinación cromatográfica de las fracciones de columna.</i>	- 36 -
CAPÍTULO III.....		- 37 -
RESULTADOS Y DISCUSIONES		- 37 -
3.1	Análisis de la especie vegetal.....	- 37 -
3.1.1	Comprobación taxonómica e identificación botánica	- 37 -
3.2	Obtención del extracto etanólico.	- 37 -
3.3	Análisis de los extractos	- 38 -
3.3.1	<i>Determinación de las características organolépticas y físicas del extracto etanólico.</i>	- 38 -
3.3.2	<i>Análisis fisicoquímicos cualitativo mediante reacciones de caracterización.</i>	- 38 -
3.4	Separación y purificación de metabolitos secundarios de Colca (Miconia pseudocentrophora).....	- 40 -
3.4.1	<i>Separación y purificación del extracto etanólico.</i>	- 40 -
3.4.2	<i>Separación y purificación del extracto en columna.</i>	- 40 -
3.7	Placas de las cromatografías en capa fina (TLC) y columna cromatográfica (CC).	- 43 -
3.7.1	<i>Placa cromatográfica del extracto etanólico</i>	- 43 -
3.7.1.1	<i>Separación del extracto en columna (CCI).</i>	- 43 -
3.7.1.2	<i>Placas cromatográficas de las 27 fracciones</i>	- 44 -
3.7.1.4	<i>Placas cromatográficas de TLC4, TLC5</i>	- 47 -
3.7.1.5	<i>Placas cromatográficas de TLC6, TLC7</i>	- 48 -
3.7.1.6	<i>Placas cromatográficas de TLC6 Y TLC7</i>	- 49 -
3.7.1.7	<i>Placas cromatográficas de TLC10 Y TLC11</i>	- 50 -

3.7.1.8	<i>Placas cromatográficas de TLC12</i> - 51 -
3.7.1.9	<i>Placas cromatográficas de TLC13 Y TLC14</i> - 53 -
	CONCLUSIONES - 58 -
	RECOMENDACIONES - 59 -
	BIBLIOGRAFÍA - 60 -
	ANEXOS - 63 -

ÍNDICE DE TABLAS

tabla 1-1. Técnicas cromatográficas	- 10 -
tabla 2-1. Eluyentes en orden creciente de polaridad.....	- 17 -
tabla 3-1: absorbentes, solventes, reveladores de los grupos flavonoides, alcaloides, quinonas, triterpenos.	- 19 -
tabla 4-2. Fracciones obtenidas de la columna c1, según el eluyente utilizado.....	- 26 -
tabla 5-2. Fracciones obtenidas según el eluyente utilizado en la microcolumna de la fracción 6.	- 29 -
tabla 6-2. Fracciones obtenidas según el eluyente utilizado en la microcolumna de la fracción 2, 3 y 4 de c2 más la fracción 6 de c2.....	- 30 -
tabla 7-2 fracciones obtenidas según el eluyente utilizado en la microcolumna de la fracción 22.	- 32 -
tabla 8-2. Fracciones obtenidas del subextracto toluenico del extracto etanolico, según el eluyente utilizado.....	- 33 -
tabla 9-2. Absorbancia y longitudes de onda de los cristales de la fracción 13 c2 obtenidas por espectroscopia uv.....	- 34 -
tabla 10-2. Absorbancia y longitudes de onda de los cristales de la fracción 31 obtenidas por espectroscopia uv.....	- 34 -
tabla 11-2. Absorbancia y longitudes de onda de los cristales de la fracción 43 obtenidas por espectroscopia uv.....	- 34 -
tabla 12-2. Fracciones obtenidas del subextracto butanolico extraido de la fase acuosa, según el eluyente utilizado	- 35 -
tabla 13-2. Características organolépticas y físicas del extracto etanolico.	- 38 -
tabla 14-2 características químicas del extracto etanolico.	- 39 -
tabla 15-3. Valores obtenidas por espectroscopia ir	- 54 -
tabla 16-3. Valores obtenidas por espectroscopia ir	- 55 -
tabla 17-3. Valores obtenidas por espectroscopia ir	- 56 -
tabla 18-3. Valores obtenidas por espectroscopia ir	- 57 -

ÍNDICE DE IMÁGENES

IMAGEN 1-1. COLCA UBICADO EN GUALLABAMBA- CHAMBO.	- 6 -
IMAGEN 2-1: SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.....	- 13 -
IMAGEN 3-1. DEFINICIÓN DE R_f	- 14 -

INTRODUCCIÓN

La flora del Ecuador es una de las más ricas del mundo tanto en plantas nativas como en las introducidas, muchos de estos vegetales son utilizados en la medicina ancestral por las personas generalmente de las poblaciones aledañas a la ciudad que conservan el uso de vegetales, especialmente en la terapia de enfermedades como la inflamación, la influenza, la hemorragia, etc. Esto se debe a que no acuden a los centros de salud por la distancia o porque les piden que adquieran medicamentos lo cual influye en su economía. El reino vegetal en sus distintas formas en las cuales las mismas se presentan va siendo un factor decisivo en lo competente en los diferentes estudios terapéuticos realizados. La identificación de algunas plantas útiles y de otras dañinas nos han permitido poder llegar al conocimiento del poder curativo que está presente en la naturaleza, el cual se va incrementando en el estudio de sus componentes, para mediante esto poder reconocer aquellas beneficiosas para la salud de la humanidad.¹

Según Olga Lock la utilización de las plantas en medicina de los EE.UU. es del 25% de las prescripciones médicas, contenían principios derivados de plantas (no menor de 24% ni mayor de 26%); e indica que si el extracto crudo posee el efecto farmacológico, podría parecer contradictorio el hecho de tener que aislar el principio activo pero es justificado si se considera que: “La ingestión oral del extracto puede tener, en algunos casos, menor efecto que la aplicación intramuscular de principio activo aislado, y en este caso debe ser una sustancia pura. Debe conocerse la pureza y concentración de la droga al administrarse, lo que no será posible al utilizarse directamente como extracto. La concentración del principio activo en las plantas es pequeña (generalmente 0,1- 2,0%; en otros casos menor que 0.1%).”²

En la bibliografía revisada no existen estudios fitoquímicos, ni de metabolitos secundarios acerca de la planta en estudio, razón por la cual se propone la separación, purificación e identificación de los metabolitos secundarios presentes en el extracto indicado anteriormente, y se obtiene una metodología de preparación del extracto etanólico con vegetal fresco previamente muestreado, un proceso de separación de clorofilas en su

¹<http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/introduccion-a-la-farmacognosia/plantas-medicinales/>

² LOCK O., Manual de Fitoterapia, Fondo Editorial PUCP, 1994, pp. 41-44.

mayor cantidad, una mezcla de solventes constituidos por hexano, acetato de etilo, metanol para la separación en columna una metodología cromatográfica de monitoreo en placas de Silica gel GF₂₅₄, con solventes de corrido como: Hexano: Acetato de etilo, Ácido acético: Acetato de etilo: Acido fórmico: Agua, Butanol: Agua: Ácido acético, Cloroformo: Metanol: Agua, en diferentes concentraciones, como solvente revelador vainillina ácido sulfúrico por calentamiento y sulfato de cerio, determinación de los R_f, forma de la mancha, separación entre manchas condiciones necesarias para determinar si la purificación se realizara en columna cromatográfica o en placa preparativa. En el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

Separar, purificar e identificar los posibles metabolitos secundarios de extracto etanólico de Colca (*Miconia pseudocentrophora*). Recolectar el vegetal e identificar la parte botánica del vegetal en estudio. Preparar un extracto en etanol al 80%. Separar los metabolitos por técnicas como: liquido-liquido, cromatografía de columna y comprobar similitud de fracciones para reunirlos. Purificar por columna cromatográfica, cromatografía de capa fina preparativa y cristalización. Identificar los metabolitos por pureza cromatográfica, pruebas físicas y espectroscopia IR, UV.

Mediante la presente investigación fue posible la separación y purificación de algunos de los metabolitos secundarios presentes en la Colca, aplicando técnicas cromatográficas como capa fina, columna cromatográfica, y placa preparativa, posterior a esto se realizó el análisis espectrofotométrico ultravioleta, que permitió establecer las posibles estructuras de algunos compuestos aislados

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Plantas medicinales

Se denomina a una planta medicinal a aquella planta cuyas partes o extracto se utilizan como drogas o medicamentos para el tratamiento de alguna afección o enfermedad que padece un individuo o animal.

Las plantas medicinales en el Ecuador han ido incrementándose ya que nuestros habitantes de la población utilizan muchas de estas para su diario vivir como una herramienta indispensable para poder aliviarse de cualquier dolencia que se les presente.³ Ecuador es un país muy rico en su flora por lo cual estamos rodeados de muchas especies de plantas las cuales en cada sector de la población se las usa de diferentes modos, se encuentra gran variedad de plantas especialmente en los mercados de nuestro país gracias a su uso como plantas medicinales por los habitantes.⁴

1.2 Principio activo

Las plantas pueden almacenar y también producir dentro de sus cuerpos diversas sustancias. Las mismas, que pueden utilizarse con fines medicinales. Las plantas están compuestas de algunos principios activos, los mismos que van acompañados de otras sustancias sin valor medicinal. Por lo general, se dice que la distribución de los principios activos que poseen las plantas medicinales no tienen una distribución uniforme por toda la planta, sino que de mejor manera se agrupan en ciertas partes de las mismas como puede ser: hojas, sus flores, semillas o en las raíces; también se asegura que la cantidad de principios activos que posee la planta no siempre es la misma, ya que puede diferenciarse por la época en la que se dio la recolección, en la forma de la preparación que se le dio a la planta, en su función del habitat. Finalmente se dice que para tener los efectos esperados de las plantas medicinales es importante tomar en cuenta la época de recolección y la preparación que se las deba hacer a cada una de las plantas.

³ RIOS, M Y OTROS., Plantas útiles del Ecuador, Quito - Ecuador, 2007, pp.652

⁴<http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/introduccion-a-la-farmacognosia/plantas-medicinales/>

El principio activo es la sustancia que posee acción farmacológica sobre determinadas dolencias o enfermedades mitigando sus efectos o resolviendo su curación.

Los principios activos son los responsables de que se altere o de la misma manera se modifique el funcionamiento de los órganos, y del sistema del cuerpo humano o animal, se dice que existe una gama de principios activos los cuales desempeñan cada uno de estos una función específica y que gracias a estos cada planta posee su efecto esperado.⁵

Segun Masson los principios activos son las sustancias responsables de la acción farmacológica como ejemplos tenemos los valeropotriatos y el ácido valeremico son los principios activos de la raíz de la valeriana, los eterosidos cardiotónicos como la digoxina y los lanatocidos lo son de la hoja del digital lanata, y la hemetina de la raíz de la ipecajuana, e indica que el desarrollo de los métodos analíticos que garanticen un mejor control de la calidad deben estar constando en la monografía de un vegetal por cuanto producto natural no es sinónimo de inocuo y la eficacia de un fitofármaco se consigue solo con el uso adecuado de los preparados fitoterapicos, tanto en lo que se refiere a las indicaciones como a la forma de administración por lo que es necesario garantizar su calidad, seguridad y eficacia.

Catarina en el estudio de los agaves indica que los vegetales constituyen un amplio campo en la investigación farmacológica con grandes posibilidades para llegar al conocimiento de nuevas drogas. Los principios activos son en general metabolitos secundarios relativamente estables que se pueden encontrar tanto en la planta fresca como en planta desecada.⁶

1.3 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios de las plantas son los compuestos químicos que las mismas los sintetizan para que puedan cumplir funciones no esenciales en las ellas, por lo tanto se puede concluir que la carencia de metabolitos secundarios no contribuye de forma que le afecte a las características de la planta porque no actúan en el metabolismo primario de las plantas.

El metabolismo primario es el conjunto de procesos metabólicos que tienen una función específica en la planta, podemos mencionar la respiración, la fotosíntesis y el transporte de los nutrientes esenciales a la planta, la distribución de los compuestos que forman el metabolismo primario tiene una distribución variada en cada vegetal.

⁵www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/farmacoergasia/principio-activo/

⁶ VALVERDE E., Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos, Cali, Colombia, 2000, pp.45

Los vegetales no solamente están constituidos por celulosa, clorofila, sino también contienen metabolitos primarios como azúcares, grasas, almidones aceites y metabolitos secundarios que son productos finales del metabolismo celular y están en mínimas cantidades generalmente miligramos y pueden estar constituidos por terpenos, que se clasifican por unidades de isopreno, a la vez el isopreno está constituido por moléculas de cinco átomos, dos moléculas, ósea diez átomos de carbono constituyen los monoterpenos, diez átomos los diterpenos, quince los sesquiterpenos, veinte diterpenos, treinta triterpenos; derivados del fenol con estructura $C_6 - C_3 - C_6$ que constituyen los flavonoides, las quinonas que tiene como característica dos grupos cetónicos y finalmente moléculas con un núcleo de nitrógeno que constituyen los alcaloides.⁷

En la mayoría de los vegetales estudiados, la mezcla de metabolitos o fitocomplejos son los responsables de las actividades biológicas; pero si se va a incluir el uso del vegetal en la alguna terapia humana, se debe cumplir con parámetros existentes en las monografías y para realizar la misma uno de los indicativos es la presencia de metabolitos que son de tres clases: marcadores químicos o sustancias presentes en el vegetal. Se define como marcador en el tamizaje fitoquímico al grupo fitoquímico que se presenta en mayor cantidad o intensidad de coloración, el primero es el marcador biológico; cuando es una sustancia la responsable de la actividad biológica, el segundo marcador químico; cuando es una sustancia identificada por cromatografía y finalmente marcador espectroscópico cuando la sustancia es identificada por algún tipo de espectroscopia.

En general los metabolitos primarios y secundarios pueden tener actividad biológica determinada: medicinal, toxica, alimenticia; puede tener aplicación casera o industrial en síntesis, es necesario conocer los vegetales de nuestro país y darles un uso adecuado, una producción sustentable y sostenible; aprovechar y disfrutar de los recursos que la naturaleza nos ofrece

1.4 Fitocomplejo

Un fitocomplejo es el conjunto de todas las sustancias que se encuentran en un vegetal, como sus principios activos y con los demás componentes, con la misma importancia de todos para determinar la actividad de la planta.

⁷<http://quimica.laguia2000.com/reacciones-quimicas/metabolitos-secundarios-de-las-plantas>

Es la mezcla de las sustancias activas y de otras que actúan como acompañantes en conjunto para tener como resultado el mismo que se espera, el cual no sería el mismo si se administrarían por separado.⁸

1.5 Muestra

La muestra debe cumplir con los siguientes parámetros: lugar de recolección, identificación botánica, proceso de muestreo, proceso de extracción, análisis preliminar cromatográfico, proceso de separación y purificación y proceso de identificación de metabolitos secundarios.

La muestra está constituida por la parte aérea del vegetal en época de floración y son procesadas, frescas, debido a que los procesos de secado dan como resultado un producto final con su contenido inferior a los principios activos.⁹

1.6 Extracto vegetal

Es una sustancia, la cual en forma concentrada se extrae de otra, la misma que debe conservar sus propiedades, y la cual nos permite aprovechar sustancias útiles de la misma. Es el producto o residuo que se obtiene después de la eliminación del solvente de extracción generalmente a presión reducida de un proceso de extracción.

Los extractos vegetales se clasifican según su consistencia en fluidos, blandos y secos.²

1.6.1 Extracto vegetal fluido:

Como el propio nombre lo indica, los fluidos son líquidos y corresponden, en general, a la droga seca en una proporción de 1:1 (un ml del extracto corresponde a un g de la droga seca).¹⁰

1.6.2 Extracto vegetal blando:

Son semi-sólidos, con contenido de agua alrededor de un 60%.

1.6.3 Extracto seco:

Son sólidos, polvos o granulados.

⁸ http://www.nexusediciones.com/pdf/gine2005_1/gi-6-1-004.pdf

⁹ CUMANDÁ J., Texto Básico de Farmacognosia, CDR, Riobamba – Ecuador 2004, pp. 16.

¹⁰ LOCK O., Manual de Fitoterapia, Fondo Editorial PUCP, 1994, pp. 20-44.

² LOCK O., Manual de Fitoterapia, Fondo Editorial PUCP, 1994, pp. 41-44.

1.7 Lugar de recolección

Indicando con las coordenadas geográficas longitud y latitud, el nombre de la localidad, ubicación geográfica, y si es una planta silvestre o cultivada, el nombre del colector, datos que deben constar en el boucher.²

1.8 Identificación botánica

Generalmente se da el nombre científico de acuerdo a las características macromorfológicas del boucher y se realizan en los herbarios.

1.9 Proceso de muestreo

Es la limpieza del vegetal de materiales extraños como otros vegetales e impurezas como tierra, luego el lavado del vegetal con hipoclorito de sodio al 5 por 1000 para eliminar microorganismos, eliminación del hipoclorito con abundante agua y secado al ambiente

1.10 Proceso de extracción

Aplicado es el de maceración que consisten en poner en contacto la droga y el solvente, durante varios días. Se trata de un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración entre la droga y el solvente y depende del tamaño de la partícula contenido de humedad, tipo de solvente, temperatura, tiempo de extracción, es un proceso de equilibrio de concentración.¹¹

1.11 Colca (*Miconia pseudocentrophora*):

1.11.1 TAXONOMÍA

Nombre científico: *Miconia pseudocentrophora*

Nombre común: Colca

Familia: *Melastomataceae*

¹¹<http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/m%C3%A9todos-de-extracci%C3%B3n/>

IMAGEN 1-1. COLCA UBICADO EN GUALLABAMBA- CHAMBO.



1.11.3 Descripción botánica

Esta planta es una especie que posee una flor es de la familia de las *Melastomataceae*, es un arbusto, pequeño árbol de tres a siete metros de altura. Compuesto por hojas simples, opuestas, de margen entero y envés con pubescencia de color café, de la misma forma con nervaduras principales las mismas que se extienden desde la base de la lámina hasta el ápice.

Sus flores: están dispuestas en panículas terminales, constan de cinco pétalos blancos, filamentos blancos y anteras moradas.

Los frutos: posee de bayas verdes que cuando están inmaduras y negras al madurar, con numerosas semillas.

De igual manera posee varias especies arbustivas que se cultivan en jardines extensos, ya que contienen alimento para la fauna silvestre. Si se hallan cerca de los ríos, sirven de alimento para los peces.¹²

La información bibliográfica encontrada sobre *Miconia pseudocentrophora* indica que existen *Miconia argénte*a, *M squamulosa*, *M calvesnces*, *M caudata*, *M crocea* conocida como Colca en español propio de Tungurahua. *M salasacaes* es un árbol utilizado para los procesos de teñido con cochinilla, se utilizan las hojas, y también se encuentra la *Miconia goniostigma*, *M triana*, *M theaezans*(Bonpl.) Cogn. In Mart, la cual se la utiliza

¹² CAMPBELL, P. 2006. CAMPBELL, P. et.al.2006.Buiquímica Ilustrada.5.ed.España.Elsevir Masson.pp.199. 2006.

para la indigestión y dolor de estómago, las hojas frotadas sobre el área del estómago en Carchi, *Miconia lugonis* Wurdack, *Miconia obscura* (Bonpl) Naudin en Saraguro, *Miconia papillosa* (Ders) Naudin en Santa Rosa Pichincha, los taninos de la corteza se usan como astringente, en Loja *M. tinifolia* Naudin(en Saraguro), todas estas *Miconias* propias de la sierra, en Chimborazo no se ha indicado por parte de ríos Monserrat pero existe un Boucher en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo politécnica identificada por Jorge Caranqui curador del herbario.¹³

1.11.4 Aplicaciones y usos

La medicina ancestral de Chambo utiliza este vegetal como antiinflamatorio dato que ha sido utilizado por Parra Paulina para determinar científicamente si cumple in vitro con esta actividad bibliográfica, para así poder incorporar este vegetal a la terapia Fitofarmacéutica.

1.11.5 Composición química

Se ha comprobado con el extracto etanólico, observándose como datos humedad 48%, cenizas 2.91, rendimiento extracto 97.5%, liquido turbio; marrón, endulzante, amargo; pH 3.60; índice r. 1,363; densidad relativa 0,97g/mL; metabolitos, flavonoides, alcaloides, quinonas, triterpenos.¹⁴

Revisada la información bibliográfica existente sobre la *Miconia* no se encontraron datos, el extracto etanólico estudiado por Paulina Parra fue preparado por maceración estática de una planta silvestre libre de contaminación por pesticidas utilizados para la eliminación de malezas como el furadan, ranger, etc. De igual manera libre de clorofilas fueron determinadas las propiedades físicas, obteniéndose la humedad por método gravimétrico, cenizas por método de degradación térmica color, aspecto por métodos visuales, pH por método potenciométrico, densidad por método gravimétrico y la presencia de los metabolitos, flavanonas, triterpenos, quinonas y cumarinas por tamizaje fitoquímico y finalmente la actividad antiinflamatoria por actividad in vitro con las técnicas de AMARILIS SARAIVA GOMEZ que constan en el manual de ensayos toxicológicos y farmacológicos experimentales in vivo e in vitro. El tamizaje fitoquímico indica la presencia de flavonoides, por la reacción de Shinoda, alcaloides con la reacción Dragendorff, quinonas con la reacción de Borntrager, triterpenos por la reacción de

¹³ GATUSO, M. 1999. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL ANALISIS DE DROGAS EN POLVO. 1999

¹⁴ dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/722/1/56T00240.pdf

Lieberman Burchard. La actividad antiinflamatoria comprobada en la pata de rata con inflamación inducida por carragenina es del 54.7%, para el extracto etanólico datos que nos permiten realizar una separación, purificación e identificación de los posibles metabolitos existentes en el vegetal y responsables de la actividad farmacológica.¹⁵

1.12 Métodos de extracción

Los métodos de extracción nos ayudan a tener una concentración correcta de los principios activos, los mismos que se encuentran presentes en las plantas, y por lo tanto va a tener una acción mucho más real, para lo cual son necesarios realizar varios procedimientos, los cuales nos van a permitir que se pueda extraer con solventes adecuados estas sustancias beneficiosas, los mismos que se utilizan de acuerdo a su estabilidad y a la solubilidad que van a presentar.

Estos métodos de extracción van a permitir que se tenga productos en formas farmacéuticas correctas para su utilización sea esta la forma que sea de acuerdo al lugar de acción en el que se vaya a aplicar.

Gracias a estas técnicas se ha podido mejorar los procedimientos para la extracción y la obtención de sustancias activas en forma pura, las mismas que nos ayudan a la elaboración de productos con efecto terapéutico.

Las farmacopeas han incluido dentro de sus especificaciones regulaciones con fundamento científico para garantizar la calidad de estos preparados, los cuales no precisan de un control tan exacto como los medicamentos oficiales, pero deben observarse algunos cuidados en cuanto a la conservación y tiempo de almacenamiento.

Estas extracciones se diferencian de las soluciones verdaderas en que están presentes sustancias en suspensión. Los principales métodos de extracción son:

- Maceración
- Percolación
- Digestión
- Infusión
- Decocción

¹⁵ DOMÍNGUEZ X. A., Métodos de Investigación Fitoquímica, LIMUSA, 1ra. edición, México, 1979, pp. 39,40.

1.13 Maceración

Es el método de extracción de los principios activos de una planta, este es un proceso de extracción sólido-líquido. De esta manera el producto sólido (materia prima) tiene una serie de compuestos solubles en el líquido extractante que son los que se pretende extraer. La maceración consiste principalmente en dejar la planta sumergida en un disolvente durante un lapso más o menos largo. En general, en herbolaria se utiliza este método cuando la planta contiene principios activos que se perderían o se modifican cuando se les expone a un calor excesivo o cuando el disolvente pudiera alterarse por lo mismo. Un producto de la maceración es la tintura, que se prepara dejando las plantas desmenuzadas o cortezas reducidas a polvos en alcohol fino o vino tinto dentro de una botella cerrada herméticamente. Para la maceración de las plantas en vino y en alcohol deben usarse botellas o recipientes con cierre hermético. Durante el tiempo de maceración, que varía según la planta usada, debe agitarse suavemente al menos una vez al día durante 30-50 segundos¹⁶

1.14 Análisis fitoquímico

El análisis fitoquímico tiene como objetivo determinar los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal a estudiar, por ejemplo en las plantas medicinales, aplicando para ello una serie de técnicas de extracción, de separación y purificación y de determinación estructural (UV, IR, RMN, EM).

1.15 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje

¹⁶ <http://herbolaria.wikia.com/wiki/Maceraci%C3%B3n>

fitoquímico constituyen únicamente en una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico.¹⁷

1.16 Cromatografía

TABLA 1-1. TÉCNICAS CROMATIGRÁFICAS

I. De extracción:	en soxhlets.	Maceración.	Percolación	Arrastre de vapor
	Fluido supercrítico.			
II. De separación y purificación:				
Cromatografía de papel		Ascendente	CPA	
CP		Descendente	CPD	
		Circular	CPC	
		Preparativa	CPP	
Cromatografía de capa				
Delgada, CCD		Análítica	CCD	
		Preparativa	CCDP	
		Bidimensional	CCDB	
Cromatografía líquida		Adsorción		
(de columna:CC)		Partición		
		Exclusión		
		Flash		
		Al vacío		
		Intercambio iónico		
		Alta Performance, HPLC		
Cromatografía en contra-		A la gota (DCCC)		
Corriente, CCC		Alta velocidad (HSCCC)		
Cromatografía gas-líquida, CGL				
Electroforesis				
III De determinación estructural				
Espectrométricas		Ultravioleta-visible, UV- Vis		
		Infrarrojo, IR		
		Resonancia magnética nuclear		
		De protón y de carbono-13	RMN- H	
			RMN- C	
		De masa, EM		
Rayos X				
Reacciones de coloración y de precipitación				
Propiedades físicas				

FUENTE: LOCK O., Manual de Fitoterapia, Fondo Editorial PUCP, 1994

¹⁷ <http://farmacognosia-farmacauladech.blogspot.com/>

Se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra una fase móvil. Varios tipos de cromatografía son posibles, dependiendo de la naturaleza de las dos fases involucradas: sólido-líquido (capa fina, papel o columna), líquido-líquido y gases-líquido (fase vapor).

Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, llamada también activa, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido¹⁸

Todos los sólidos finamente pulverizados tienen el poder de absorber en mayor o menor grado otras sustancias sobre su superficie; y, similarmente, todas las sustancias pueden ser adsorbidas, unas con más facilidad que otras. Este fenómeno de adsorción selectiva es el principio fundamental de la cromatografía.

1.16.1 Fundamentos de la cromatografía

Color el color de la imagen se define en su conjunto inicialmente como:

Vivamente coloreada

Poco coloreada

Muy poco coloreada

En dependencia de la tonalidad que predomine en toda la imagen y posteriormente se detallan los colores característicos de cada una de las 4 zonas si son fácilmente detectables
Altura: la altura en una imagen capilar se determina midiendo con una regla graduada en cm, del borde inferior del papel a la franja graduada en cm, del borde inferior del papel a la franja, siendo esta inversamente proporcional al grado alcohólico de la muestra. La altura promedio de una imagen capilar es de 8 cm aproximadamente, de ahí que se puede clasificar las imágenes en

Altas: de 8.0 cm en adelante

Medianas: entre 5,0-8.0 cm

Pequeñas: menos de 5.0 cm

En el análisis de la imagen es posible distinguir 4 zonas

Franja: límite superior de ascensión del líquido

¹⁸ CROMATOGRAFIA, CONCEPTOS FUNDAMENTALES DE. 2009.

Sub-franja: región generalmente poco coloreada, comprendida entre la franja y la zona superior de la banda

Banda: zona generalmente pigmentada debido a la presencia de sustancias coloreadas.

Sub-banda: situada debajo de la banda hasta el límite de inmersión

Descripción de las diferentes partes

Una de las zonas de mayor interés es la franja, que esta puede ser o no translúcida, lo que denota la presencia de resinas o aceites esenciales y grasas.

En la franja también debe describirse la forma que esta adopta, dentro de ella:

Lineal

Festonada

Dentada (regular o irregular)

Profundamente dentada

En la sub-banda debe considerarse el color y la longitud de la misma. La banda debe observarse a trasluz, ya que puede ser translúcida. En algunas imágenes como en la de la tintura de 3 ajo, colombo, condurango ó aloe, no se aprecia la banda, mientras que en otras aparecen bandas dobles como grindelia

La sub-banda que comprende toda la parte de la imagen situada debajo de la banda, es quizá la menos importante, aunque debe considerarse su color

Posibles cambios por alcalinidad

La alcalinización consiste en exponer la imagen capilar a los vapores de amoníaco, para observar los posibles cambios de coloración. Es recomendable realizar la alcalinización de la imagen capilar inmediatamente después de su análisis para garantizar que la misma aun este humeda. El efecto de la alcalinización es temporal ya que debe desaparecer al retirar la tira de papel de los vapores de amoniacales.¹⁹

Las imágenes pueden variar su coloración desde el amarillo hasta el violeta, por acción de estos vapores y en otros casos puede no cambiar, es por ello que resulta de gran interés para la caracterización de la imagen

Factores que influyen en el análisis capilar

1. Factores extrínsecos

Calidad del papel filtro

Temperatura en que se desarrolla el análisis

¹⁹ WAGNER H. Y BLADT S., Plant drug analysis, 2da edition, New York , 2010, pp.60.

Tiempo de corrimiento

2. Factores intrínsecos

Tiempo de fabricación de la tintera

- a. Calidad del papel filtro el soporte del análisis capilar, o sea el papel de filtro, juega un rol importante en el aspecto de la imagen obtenida, ya que el mismo puede variar la altura de la imagen, el aspecto de la franja, etc. Debe por tanto tenerse en cuenta la clase de papel y el sentido de La fibra de papel al cortar las tiras.
- b. Y c. temperatura y tiempo de corrimiento se ha comprobado que a bajas temperaturas la altura se reduce, mientras que a temperaturas mayores de °C tiende a subir de 1 a 2 cm por encima de lo normal.

De igual forma, para corrimiento de más de 2 horas la imagen obtenida es más oscura y la franja tiende a tomar borde irregularmente dentado. Por lo que los mejores resultados se3 obtendrán para 2 horas y a temperaturas de 25°C (+_1)

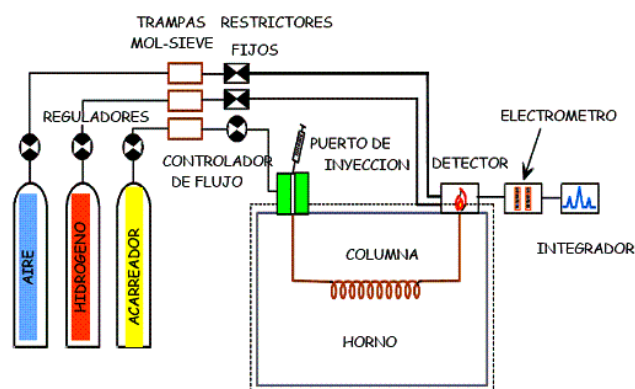
2 a. Tiempo de fabricación de la tintera

La altura de la imagen disminuye con relación a la normal para muestras de más tiempo de fabricación

El color de la imagen disminuye en intensidad en muestras con mayor tiempo de fabricación

Influye también en el aspecto de la franja y de la banda.

IMAGEN 2-1: SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA



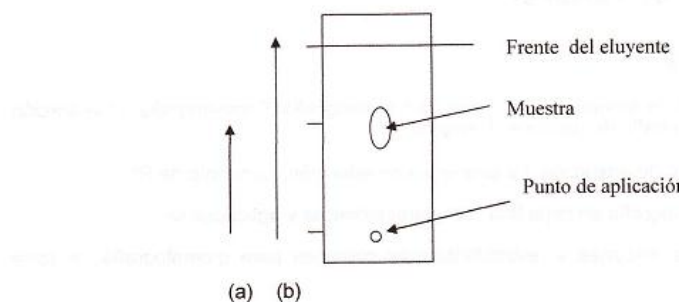
Fuente: (CROMATOGRAFIA, 2009)

1.16.2 Concepto de R_f

R_f es el registro, es una relación de distancias, y se define como:

IMAGEN 3-1. DEFINICIÓN DE R_f

$R_f = \frac{(a)}{(b)}$ distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación
(b) distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente.



El valor de R_f depende de las condiciones en las cuales se corre la muestra (tipo de adsorbente, eluyente, así como las condiciones de la placa, temperatura, vapor de saturación, etc.). Tiene una reproducibilidad de $\pm 20\%$, por lo que es mejor correr duplicados de la misma Placa.²⁰

1.16.3 Cromatografía en capa fina (CCF)

En la cromatografía en capa fina (CCF) la fase estacionaria consiste en una capa delgada de un adsorbente (como por ejemplo gel de sílice, alúmina o celulosa) depositada sobre un soporte plano como una placa de vidrio, o una lámina de aluminio o de plástico.

La CCF es una técnica analítica y tiene como objetivo el análisis de una mezcla de componentes.

El proceso es similar a la cromatografía de papel con la ventaja de que se desarrolla más rápidamente, proporciona mejores separaciones y se puede elegir entre diferente adsorbente. La CCF es una técnica estándar en el laboratorio de química orgánica. Debido a su simplicidad y velocidad, la CCF se utiliza a menudo para monitorizar las reacciones químicas y también para el análisis cualitativo de los productos de una reacción, puesto que permite conocer de manera rápida y sencilla cuántos componentes hay en una mezcla.²¹

²⁰ VEROTTA V., Virtual activity real pharmacology, Milano, Italia, 1997, pp.50-60.

²¹ es.wikipedia.org/wiki/Cromatografía_en_capa_fina. [En línea] 12 de 09 de 2014.

En este caso se utiliza una placa recubierta con fase estacionaria manteniendo un pequeño espesor constante a lo largo de la placa. El eluyente ascenderá, por capilaridad, por la placa y arrastrará los componentes a lo largo de ésta produciendo "manchas" de los componentes.

1.16.3.1 Adsorbentes más comunes para cromatografía en capa fina.

- a) Gel de sílice (se utiliza en el 80% de las separaciones)
- b) Oxido de Aluminio ó Alúmina (ácida, neutra o básica)
- c) Celulosa (Nativa o micro-cristalina)
- d) Poliamidas.¹³

1.16.4 Cromatografía de capa fina preparativa

La cromatografía preparativa comprende un amplio campo de aplicaciones, desde el aislamiento de 1 µg. de muestra para identificación espectroscópica hasta el aislamiento de un compuesto puro de una mezcla de 100 g. La cromatografía preparativa se diferencia de la técnica básica en muchos aspectos, desde la preparación de la papilla. Ésta debe hacerse con menos agua que de ordinario. Una papilla más espesa ayuda a estabilizar el grosor de las placas que se precisa para una carga de mayor magnitud. El espesor óptimo oscila desde un mínimo de 1 mm. Hasta un máximo de 2 mm.²²

1.16.5 Parámetros cromatográficos

1.16.5.1 Eficacia

La eficiencia de los metabolitos secundarios en cromatografía de capa fina con cualquiera de los solventes Silica gel g oxido de aluminio poliamida fase reversa rp₁₈, está dada por la distribución de manchas redondas desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente con espacios de separación entre las manchas.

1.16.5.2 Eficiencia

La eficiencia está determinada por la presencia de manchas en la superficie de la placa cromatográfica y pueden presentarse los siguientes casos que las manchas sean alargadas sin separación para mejorar las condiciones se debe cambiar los componentes del solvente de corrido por otros de similar polaridad basándose en los valores de la constante

²² www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia_tipus.html. [En línea] 19 de 09 de 2009.

dieléctrica de algunos solventes de los fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos.²³

En el caso de manchas redondeadas que no se distribuyen en toda la placa y permanecen en la base es necesario aumentar la polaridad del solvente de corrido lo cual se obtiene con el aumento del volumen del solvente más polar que da una aumento de la polaridad total de lo solución.

En el caso de manchas redondas distribuidas en la parte superior o junto al frente del solvente es necesario bajar la polaridad para lo cual se disminuye el volumen del solvente más polar.

1.16.5.3 Resolución

Decimos que una placa cromatográfica contiene este parámetro cuando las manchas son redondeadas distribuidas desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente con espacios de separación entre las manchas que permitan realizar un raspado de franjas en el caso de realizarse cromatografía de capa fina preparativa.

1.16.6 Elución en columna

Es la extracción de una sustancia absorbida desde un lecho poroso o columna de cromatografía por un chorro de líquido, gas o mediante la aplicación de calor. Este término se da también a la extracción de anticuerpos o trazadores radiactivos de los eritrocitos.²⁴

1.16.6.1 Solventes utilizados para la elución

La elección del eluyente depende del componente que se va a separar y del material en que la separación se lleva a cabo. Un método que se emplea para la selección del eluyente es una cromatografía en capa fina con distintos disolventes y unas muestras patrón.²⁵

²³ **WAGNER H. Y BLADT S.**, Plant drug analysis, 2da edition, New York , 2010, pp.60.

²⁴ http://organical.org/1311/1311_6.pdf

²⁵ <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/Thin.htm>

TABLA 2-1. ELUYENTES EN ORDEN CRECIENTE DE POLARIDAD

ELUYENTES EN ORDEN CRECIENTE DE POLARIDAD
Éter dietílico
Ciclohexano
Acetato de etilo
Tetracloruro de carbono
Benceno
Etanol
Cloroformo
Metanol
Diclorometano
Agua
Ácido acético

Fuente: (CROMATOGRAFIA, 2014)

Al aplicar en primer lugar eluyentes poco polares, podemos seguir utilizando la misma placa para aplicar otros eluyentes más polares, hasta dar con el más apropiado.

1.16.7 Cromatografía en placa preparativa.

La cromatografía preparativa se lleva a cabo en placas de gel de sílice de 1-2 mm de espesor sobre un soporte de vidrio. Se utiliza para la separación y aislamiento de los componentes de una mezcla en cantidades comprendidas entre 100-200 mg.

En la superficie del adsorbente (gel de sílice), mediante una pipeta Pasteur, se traza una línea continua con la muestra disuelta y se introduce la placa en posición vertical en una cubeta. Durante la elución debe permanecer tapada para evitar la evaporación del disolvente, y para que todo el ambiente sea semejante. Una vez que se han separado los productos que componen la muestra, se marca con una cuchilla el contorno del compuesto a aislar y con ayuda de una espátula se desprende del soporte de vidrio el gel de sílice con el compuesto adsorbido. Una vez transferido a un erlenmeyer se añade un disolvente en el cual sea soluble el producto, se filtra el gel de sílice y una vez eliminado el disolvente tenemos el producto puro²⁶

²⁶ <http://www.uprm.edu/biology/profs/velez/cromatografias.htm>

1.16.8 Cromatografía de columna.

En la cromatografía de columna las moléculas de una mezcla son separadas en base a la afinidad de las moléculas por la fase estacionaria o por la fase móvil. Si una molécula A tiene más afinidad por la fase estacionaria que la B, B bajará más rápido que A. Existen muchos tipos de cromatografía de columna

1.16.8.1 Procedimiento.

La cromatografía en columna utiliza una columna de vidrio vertical que se llena con un soporte sólido adsorbente (fase estacionaria: los más utilizados son gel de sílice (SiO_2) y alúmina (Al_2O_3)). La muestra que se quiere separar se deposita en la parte superior de este soporte. El resto de la columna se llena con el eluyente (disolvente que constituye la fase móvil) que, por efecto de la gravedad, hace mover la muestra a través de la columna. Se establece un equilibrio entre el soluto adsorbido en la fase estacionaria y el disolvente eluyente que fluye por la columna. Debido a que cada uno de los componentes de una mezcla establecerá interacciones diferentes con la fase estacionaria y la móvil, serán transportados a diferentes velocidades y se conseguirá su separación. Así, de manera similar a otros tipos de cromatografía, las diferencias en las velocidades de desplazamiento a través del medio sólido se corresponden con diferencias en los tiempos de elución por la parte inferior de la columna para cada uno de los componentes de la muestra original, que se recogerán en fracciones diferentes

La polaridad del eluyente afecta las velocidades relativas con las que los diferentes componentes de la mezcla se mueven en la columna. Los disolventes polares compiten más eficientemente con las moléculas polares de una mezcla por los lugares polares del adsorbente. Por lo tanto, un disolvente polar desplazará las moléculas, incluyendo las más polares, rápidamente a través de la columna. Si el disolvente es muy polar la elución será muy rápida y generalmente habrá poca separación de los componentes de la mezcla. Si por el contrario el disolvente es muy apolar, no eluirán los compuestos de la columna. Por lo tanto, la elección del eluyente es crucial para el éxito de la cromatografía en columna. A menudo se utiliza un gradiente creciente de polaridad para la elución. La CCF se utiliza para determinar y elegir el sistema solvente adecuado para cada separación ²⁷

²⁷ http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia_tipus.html

1.16.8 Pureza cromatográfica

Si en la banda de a elución del compuesto comparada con la de los reactivos solo aparece una mancha definida (mejor si es comparada con un patrón), entonces el criterio de pureza es aceptable. Si aparecen varias manchas o una mancha difusa, el criterio de pureza no es aceptable.

TABLA 3-1: ABSORBENTES, SOLVENTES, REVELADORES DE LOS GRUPOS FLAVONOIDES, ALCALOIDES, QUINONAS, TRITERPENOS.

Secuencia	Orden de elución de compuestos	Actividad de adsorbentes	Fuerza de elución de disolventes
<div>-</div> <div>↓</div> <div>+</div>	Hidrocarburos saturados	Celulosa	Eter de petróleo
	Hidrocarburos aromáticos		Ciclohexano
	Derivados halogenados		Benceno
	Eteres		Tetracloruro de carbono
	Cetonas	Sulfato cálcico (yeso)	Diclorometano
	Aldehídos	Silice	Cloroformo
	Esteres	Florisil	Eter dietílico
	Alcoholes	Oxido de magnesio	Acetato de etilo
	Aminas	Alúmina	
	Acidos	Carbón activo	Acetona
			n-propanol
			Etanol
		Metanol	
		Agua	
		Acido acético	

Fuente: (CROMATOGRAFIA, 2009)

1.16.9 Técnica de extracción y caracterización de sapogeninas esteroidales en drogas vegetales.

Las saponinas y en particular las que contienen un aglicón de tipo esteroidal son de gran interés para la industria farmacéutica, ya que los núcleos esteroidales sirven como fuente de materia prima para la síntesis parcial de hormonas.

El procedimiento se da de la siguiente manera se pesa 50 g de droga se mezclan con 250 ml de HCL 4 mol/L y se calienta a reflujo durante 1 hora. Se filtra en caliente lavando el residuo varias veces con agua fría.

El líquido ácido del filtrado se elimina y el residuo se seca. El residuo oscuro seco se coloca en el dedal de un equipo Soxhlet y se extrae durante 45 min. Con n-hexano o éter de petróleo (no menos de 15 descargas del equipo)

El solvente se concentra y el residuo se pesa para calcular el % de rendimiento. El extracto de saponinas se redisuelve en 1 ml de cloroformo. Se puntea del mismo en una placa cromatográfica de silica gel G para observar las sapogeninas presentes, revelando con ácido sulfúrico al 50% y calor.

1.16.10 Espectroscopia ultravioleta (U.V) y visible (V)

Son numerosos los ejemplos de los triterpenos que presentan absorción al ultravioleta característica de los grupos cromóforos que ellos presentan. Es importante señalar que ellos pueden presentar una, dos o tres bandas de absorción lo que permite una clasificación preliminar para la determinación estructural de los triterpenos.

La intensidad de una banda de absorción particular se expresa generalmente por su coeficiente de extinción molar que se deduce de la ley de Lambert-beer:

$$A = \epsilon lc; c = \frac{A}{l\epsilon}$$

Donde I_0 es intensidad de la luz incidente, I la intensidad de la luz transmitida, c es la concentración molar, d es el ancho de la cubeta expresada en cm y ϵ es el coeficiente de extinción molar.²⁸

El coeficiente de extinción molar puede ayudar al reconocimiento de ciertas funciones lo que a su vez puede ser comprobado con reacciones específicas de coloración con tetranitrometano (TNM), y FeCl_3 entre otras.

Los triterpenos pentacíclicos al adicionarles ácido sulfúrico muestran absorciones características a 310nm que son independientes de los sustituyentes que ellos presentan. Algunos datos obtenidos de espectros ultravioleta son importantes incluso para el análisis conformacional.

²⁸ <http://sistemas.fciencias.unam.mx/~fam/Infrarroja.pdf>

CAPÍTULO II

2. DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Lugar de la investigación

La presente investigación se desarrolló en:

- Laboratorio de Fitoquímica de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 Recursos materiales

2.2.1 Recolección del vegetal

Se recolecta el vegetal tanto tallo, hojas, flores y frutos de Colca (*Miconia pseudocentrophora*), del bosque nativo de Guallabamba del cantón Chambo, provincia de Chimborazo.

2.3 Comprobación taxonómica e identificación botánica.

Se tomó la muestra de Colca (*Miconia pseudocentrophora*), la misma que incluyo tallos con ramas, hojas, flores, frutos y semillas, luego su prensado, fue llevada al herbario de la ESPOCH, dirigido por el Ing. Jorge Caranqui, quien certificó el ejemplar.

2.4 Procesamiento de la materia prima.

Una vez recolectado el vegetal se procedió a la limpieza del mismo.

- Se realizó una agitación del vegetal para eliminar el polvo y las hormigas que se encontraban en el mismo.
- Luego se procedió al lavado con el fin de eliminar polvo y cualquier otro material residual del anterior proceso.
- Posterior a esto se colocó sobre papel, para escurrir y favorecer el secado completo.
- Una vez seco todo el material vegetal se trituro, cortando muy finamente todas las partes del vegetal con una tijera.
- Se procedió con el licuado del vegetal con etanol para tener una muestra homogénea.

2.5 Preparación del extracto

Para la obtención del extracto etanólico de Colca (*Miconia pseudocentrophora*), se utilizó todo el vegetal, mediante el siguiente procedimiento.

2.10.1 Procedimiento

La recolección del vegetal se realizó de una sola planta en época de floración y fue identificada taxonómicamente, *Miconia pseudocentrophora*

La muestra debe ser eliminada de todo tipo de contaminante microbiológico, otros vegetales, tierra; que pueden variar la composición real presente en estos vegetales.

El proceso de maceración de una muestra primero troceada y luego licuada para tener un tamaño de partícula ni muy fino ni muy grueso que ayuda en el fenómeno de osmosis o ingreso del solvente al interior de la célula (engonfiarmento o hinchamiento), de la misma y estallido dejando en el solvente los metabolitos secundarios. Por el proceso de decantado se separan el líquido y deja el sólido que constituye el residual vegetal que puede ser remacerado o eliminado.

El líquido de decantación debe ser evaporado a presión reducida para evitar la degradación de algún compuesto por efecto del calor o la salida de los aceites los esenciales; la reducción a 1 octavo de volumen permite que esté el agua del vegetal fresco en la cantidad ideal para solubilizar los metabolitos secundarios y por enfriamiento en refrigeración durante 12 horas se observa la precipitación de la clorofila en la solución. La clorofila pigmento verde que en la parte aérea se encuentra en gran cantidad influye en las reacciones de identificación química de grupos fitoquímicos, al estar constituidos por anillo pirrol dan positivas las reacciones para alcaloides, también influyen en el proceso de fraccionamiento sea liquido- liquido, solido- liquido porque incluye a los metabolitos en forma de complejos.

2.6 Evaluación de propiedades físicas y químicas del extracto etanólico.

2.6.1 Determinación de los requisitos organolépticos

A. Determinación del olor

Se introdujo un extremo de una tira de papel filtro de 1x10cm en el extracto, se percibió y determinó el olor que éste poseía.

B. Determinación del color

En un tubo de ensayo se colocó extracto hasta cubrir la base del mismo y se observó el color.

C. Determinación del aspecto

En un tubo de ensayo se colocó una alícuota de extracto y a contra luz se determinó el aspecto del mismo, su transparencia y la presencia de partículas o de fases

2.6.2 Determinación de los requisitos físicos

A. Determinación de la densidad relativa

Se pesó el picnómetro vacío y seco, posterior se lo llenó con la porción de ensayo hasta el nivel indicado y se tapó, con una tira de papel se extrajo el exceso y se secó exteriormente el picnómetro. Luego se pesó cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo.

En los resultados la densidad relativa se calculó con la siguiente fórmula:

$$\delta = \frac{P2-P1}{VP}$$

Dónde:

P1: peso del picnómetro vacío (g)

P2: peso del picnómetro con muestra (g)

VP: volumen del picnómetro (ml)

B. Determinación del índice de refracción

Para ajustar el equipo, se colocó sobre el prisma de medición una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio, y se seleccionó la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.

Se colocó una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cerró el termo prisma y se enfocó la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incidió sobre la apertura de entrada del prisma de medición, y se procedió igual que con el agua.

C. Determinación del pH

Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizó la determinación del valor del pH de la muestra. Se introdujo directamente los detectores del pH-metro en la muestra y se realiza la lectura.

2.7 Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico (a)

2.7.1 Ensayo de baljed

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1ml). En estas condiciones se adiciona 1 ml del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente.

2.7.2 Ensayo de borntrager

Es útil para detectar la presencia de quinonas. Si la alícuota no está en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 ml de cloroformo. Se adiciona 0.5 ml de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5%. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. El ensayo es positivo cuando la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado, en este caso se reporta (++) o rojo, para lo cual se reporta (+++).

2.7.3 Ensayo de espuma

Para reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 2 veces el volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

2.7.4 Ensayo del cloruro férrico

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9% en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalo-tánicos.

2.7.5 Ensayo de shidona

Permite reconocer la presencia de flavonoides. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 ml de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.

2.7.6 Ensayo de dragendorff

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).

2.8 Separación y purificación de metabolitos del extracto de colca.

La cromatografía en capa fina permite utilizar solventes específicos como Hexano: Acetato de Etilo (6:4) para terpenos de baja polaridad; Acetato de etilo: Metanol (19.5:0.5), y revelador Rosentaler y Sulfato de Cerio. De esta manera se trata de buscar la presencia de manchas y de identificar que estén presentes los parámetros de eficiencia, eficacia y resolución, ya que de esta manera se podrá seleccionar el método cromatográfico de separación y purificación para el extracto.

2.9 Separación y purificación del extracto etanólico.

Para identificar en el contenido la presencia de metabolitos secundarios que ya determinados en el tamizaje fitoquímico y que dio positivo para cumarinas, taninos, y de mayor evidencia, flavonoides y triterpenos, se probó las cromatografías en: Hexano: Acetato de Etilo (6:4), y en Acetato de etilo: Metanol (19.5:0.5) las cuales presentaron manchas. (TLC 1)

2.9.1 Separación del extracto etanólico en columna.

Las condiciones cromatográficas del extracto etanólico corrido con hexano acetato de etilo para replicar en columna C1, se tomó 1 alícuota de 10 ml (9.70g) del extracto etanólico y se colocó en la parte superior sobre la superficie de la sílica que son 60g en la columna, se inicia la elución recolectando fracciones de 20ml, en el caso de formarse bandas permitió coleccionar una fracción correspondiente a la finalización de la una e inicio de la otra. Se inició la elución con hexano, recogiendo 1-5, y se observó que la coloración amarilla ya no existía por lo cual se aumentó la polaridad de la 6 a la 15 Hexano: Acetato de etilo (6:4), de la fracción 16 a 20 Acetato de etilo: Metanol (19.5:0.5), y finalmente Metanol en las fracciones restantes.

TABLA 4-2. FRACCIONES OBTENIDAS DE LA COLUMNA C1, SEGÚN EL ELUYENTE UTILIZADO

SOLVENTE	PROPORCION	FRACCIONES
Hexano	100	1,2,3,4
Hexano : Acetato de etilo	6:4	5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
Acetato de etilo: metanol	19.5 : 0.5	16,17,18,19,20
Metanol	100	25,26,27

- Cada franja que se obtienen se recolecta en recipientes individuales. (CC 1)

2.9.2 Determinación cromatográfica de las fracciones de columna.

Las 27 fracciones recolectadas tienen tonalidades diferentes, lo cual nos ayuda para determinar la presencia de compuestos, reunión de fracciones y purificación de las mismas se muestrean por aspecto, color y cantidad de solvente eluido.

2.9.2.1 Comprobación de la presencia de metabolitos en las 27 fracciones

Se realizó la cromatografía en capa fina de estas fracciones para identificar la presencia de metabolitos secundarios y su grado de pureza, por lo que se procedió a realizarla con Hexano: Acetato de etilo (6:4), las primeras 14 fracciones, las mismas que se revelo con Rosentaler, desde la fracción 15 a la 27 se procedió a realizar con Acetato de tilo: Metanol (19.5:0.5) y se revelo con Sulfato de Cerio.

La cromatografía de las fracciones 1 a 5 corridas con Hexano: Acetato de etilo (6:4) y reveladas con Rosentaler: en la fracción 1 da un compuesto anaranjado de Rf. 7.3. La fracción 2 presenta compuestos rojos y violetas de Rf. 5, 6.5, 7.2, 8.1, la fracción 3 tiene un compuesto rojo y sobrepuesto un compuesto rojo y violeta con Rf. 6.5 y 7, la fracción 4 tiene dos compuestos violetas con Rf.6.8 y 7.2, finalmente la fracción 5 tres compuestos violetas con Rf. 5.5. 7.5 y 8.2, los compuestos violetas indican la presencia de terpenos y en el caso de una sola mancha pueden estar puros, si las manchas son de diámetro grande indican mayor cantidad y diámetros pequeños pequeña cantidad.

La 7 y la 8 son las mismas la 9 está en mínima cantidad y es otro compuesto, 10 casi no se ve por lo tanto la 11 presenta compuestos similares a la 13 y la 14 ya no se desplaza se queda en el punto de aplicación

Las fracciones 6, 7 y 8 al revelarse con Rosentaler indican que contienen compuestos con Rf. similares, mientras que la 9 está en mínima cantidad, la fracción 10 no contiene compuestos la fracción 11 tiene tres compuestos pegados a la base o aplicación, la fracción 12 no presenta terpenos y la fracción 13 es similar a la 11.

La fracción 15 posiblemente es una mezcla de dos grupos fitoquímicos diferentes por cuanto el color violeta es característico de terpenos, mientras el color anaranjado pueden ser flavonoides y serán necesario aumentar la polaridad del solvente de corrido y revelar con Sulfato de cerio para determinar la presencia o ausencia de flavonoides. En las fracciones de 16 a 19 la mancha de diámetro grande y de color violeta con el reactivo de Rosentaler indica la presencia de terpenos que deberán realizarse cromatografías con

aumento de polaridad revelados con sulfato de cerio para observar si existen más de los terpenos derivados fenólicos. Las fracciones 20 a 26 contienen terpenos por su coloración violeta al estar de solvente Acetato de etilo y Metanol pueden tratarse de saponinas pero debe analizarse la presencia de flavonoides, y la fracción 27 se la deja sola por su color amarillo intenso que en este se presenta.

Por lo tanto unimos las fracciones 2,3,4, luego la fracción 5 y 6, unimos 7, 8, 9, 10, se une 11 y 12, 13 14 y 15 las dejamos solas por las manchas que estas presentan, se une 16 y 17, luego se une de la fracción 19 a la fracción 26, y la fracción 27 la dejamos sola.

2.9.2.2 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones unidas 2, 6, 7, 11, 13 y 14.

Después de realizar la unión de algunas fracciones, se procedió a realizar la cromatografía en capa fina de estas fracciones en Hexano: Acetato de etilo (6:4), y revelado con Rosentaler, se une las fracciones 2,6 y 7 porque presentan similares Rf. 0.06, 0.11, 0.22, 0.36 para la primera, 0.06, 0.10, 0.13, 0.22, 0.38 para la segunda, y para la tercera 0.06, 0.11, 0.13, 0.21, 0.38. En el caso de las fracciones 11, 13 y 14, presentan 4 manchas redondeadas con Rf. que van desde 0.06 hasta 0.41. (TLC 5)

2.9.2.3 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones unidas 16, 18, 19, 23 y 27.

Para continuar con la separación y purificación se realizó la cromatografía en capa fina, para lo cual se usó como solvente de corrido Acetato de etilo: Metanol (19.5:0.5) y como revelador Sulfato de Cerio.

La fracción 16, 18,19 y 23 las unió ya que tienen las manchas con sus coloraciones similares, las mismas que presentan compuestos sobrepuestos y en la fracción 23 se nota como hay más de todos los otros compuestos, presentan similitud con sus Rf.

La fracción 27 la dejamos sola ya que presenta una gama de colores diferentes a las otras, las mismas que podemos volver a separar mediante una nueva cromatografía.

2.10 Separación de la fracción unida 6 de C1 en columna cromatográfica C2.

La columna 2 contiene 15g de silica gel y se purificaron la unión de las fracciones 2,6 y 7 de la columna 1 C1, es una columna isocrática el solvente de elución es hexano: acetato de etilo (6:4), volúmenes de 10 ml, se realiza porque en la TLC 2 presenta eficiencia, pero no tiene buena eficacia, lo que implica que no tiene resolución, presentan Rf. de 0.07, 0.09, 0.16, 0.22 y 0.45, se recolectó 14 fracciones

TABLA 5-2. FRACCIONES OBTENIDAS SEGÚN EL ELUYENTE UTILIZADO EN LA MICROCOLUMNA DE LA FRACCIÓN 6.

SOLVENTE	PROPORCION	FRACCIONES
Hexano	100	1.
Hexano : Acetato de etilo	6:4	2,3,4,5,6,7,8,9,10, 11,12,13,14.

2.10.1 Determinación cromatográfica de las fracciones de microcolumna de la fracción unida 6.

Para verificar la presencia de metabolitos, reunir fracciones y purificar se cromatografían en capa fina como se indica a continuación.

2.10.1.1 Verificación de la presencia de metabolitos en la fracción 1.

Se procedió a realizar la capa fina, como solvente de corrido se utilizó Hexano: Acetato de etilo (7:3) y como revelador Rosentaler, con la finalidad de evidenciar la separación y purificación de los metabolitos secundarios de estas fracciones.

No Presenta ninguna manchas, por lo que esta muestra ya la desechamos.

2.10.1.2 Verificación de la presencia de metabolitos en la fracción 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

Se procedió a realizar la capa fina, como solvente de corrido se utilizó Hexano: Acetato de etilo (7:3) y como revelador Rosentaler, con la finalidad de evidenciar la separación y purificación de los metabolitos secundarios de estas fracciones.

La fracción 2,3 y 4 las unimos ya que tienen Rf. similares, la 5 le dejamos sola porque presenta compuestos con colores particulares, unimos 6,7,8,9 y 10, la fracción 12 precipita y pongo metanol caliente y se disuelve, 13 y 14 también uno y haga uno solo.

2.11 Separación de las fracciones unidas 2, 3 y 4 de C2 más la fracción 6 de C2 en columna C3.

La columna 3 contiene 15g de silica gel y se purificaran la unión de las fracciones 2,3 y 4 de la columna 2 C2, más la fracción 6 que era la unión de las fracciones 6 hasta la 11 de la columna C2, es una columna isocrática el solvente de elución es hexano: acetato de etilo (8:2), las primeras 7 fracciones y luego Acetato de etilo las fracciones de 8 a 14 en volúmenes de 10 ml, se realiza porque en la TLC 3 presenta eficiencia, pero no tiene

buena eficacia, lo que implica que no tiene resolución, presentan Rf. de 0.09, 0.12, 0.20, 0.24 y 0.55, se recolectó 14 fracciones.

TABLA 6-2. FRACCIONES OBTENIDAS SEGÚN EL ELUYENTE UTILIZADO EN LA MICROCOLUMNA DE LA FRACCIÓN 2, 3 Y 4 DE C2 MÁS LA FRACCIÓN 6 DE C2.

SOLVENTE	PROPORCION	FRACCIONES
Hexano	100	0,1.
Hexano : Acetato de etilo	6:4	2,3,4,5,6,7.
Acetato de etilo	100	8, 9,10, 11, 12, 13,14.

2.11.1.1 *Determinación cromatográfica de las fracciones de microcolumna de la fracción 2,3 y 4 de C2, más la fracción 6 de C2.*

Para verificar la presencia de metabolitos, reunir fracciones y purificar se cromatografían en capa fina como se indica a continuación.

2.11.1.2 *Verificación de la presencia de metabolitos en la fracción 0, 1, 2, 3,4, 5, 6 y 7*

Se procedió a realizar la capa fina, como solvente de corrido se utilizó Hexano: Acetato de etilo (8:2) y como revelador Rosentaler, con la finalidad de evidenciar la separación y purificación de los metabolitos secundarios de estas fracciones.

Desde la fracción 3 a 7 empieza a bajar de la columna un color amarillo, en el cambio que se realizó del solvente a Acetato de etilo desde la fracción 11 empieza a bajar la primera franja amarilla de la columna.

2.11.1.3 *Verificación de la pureza de la fracción 0 de C3*

Para establecer las fracciones puras se realizó la cromatografía en capa fina con Hexano: Acetato de etilo (8:2) como solvente de corrido y Rosentaler como revelador.

La fracción 0 de la columna C3, presenta una sola mancha en la parte superior de la placa de color amarilla la misma que puede ser la presencia de un terpeno, y con su Rf, 0.35, por lo que decimos que estamos en la presencia del compuesto puro (IV).

2.11.1.4 *Verificación de la pureza de la unión de fracción 2, 3, 4, 5, 6 y 7 de C3*

Para establecer las fracciones puras se realizó la cromatografía en capa fina con Hexano: Acetato de etilo (8:2) como solvente de corrido y Rosentaler como revelador.

Estos compuestos presentaron todos la misma mancha con el frente del solvente del mismo color amarillo, sus R_fs similares por lo tanto unimos estas muestras e hicimos una sola, la misma que nos da el compuesto (VI) puro.

2.11.1.5 Verificación de la pureza de la unión de fracción 10, 11, 12, 13, y 14 de C3

Para establecer las fracciones puras se realizó la cromatografía en capa fina con Hexano: Acetato de etilo (8:2) como solvente de corrido y Rosentaler como revelador.

Estas muestras cristalizaron en MeOH, por lo tanto hicimos una división de esta muestra en un tubo dejamos el agua madre de esta muestra, y en el otro recipiente se quedaron los sólidos de la muestra, por lo tanto estos sólidos lo dejamos como el compuesto puro (VII).

2.12 Verificación de la presencia de metabolitos en la fracción 5 de la columna C2.

Se procedió a realizar la capa fina, como solvente de corrido se utilizó Hexano (100) y como revelador Rosentaler, con la finalidad de evidenciar la separación y purificación de los metabolitos secundarios de estas fracciones.

Esta fracción presenta un color característico amarillo por lo cual se procede a realizar una placa preparativa de esta fracción dándonos 4 franjas. Y dándonos el (I) compuesto puro.

2.12.1 Verificación de la pureza de la franja 4 obtenida de la placa preparativa de la banda de la fracción 5 C2.

Para establecer las fracciones puras se realizó la cromatografía en capa fina con Hexano (100) como solvente de corrido y Rosentaler como revelador.

La franja 4 de la placa preparativa de la fracción 5, presenta una sola mancha en la parte superior de la placa de color amarilla la misma que puede ser la presencia de un terpeno, y con su R_f, 0.55, por lo que decimos que estamos en la presencia del compuesto puro (V).

2.13 Separación de la fracción 22 de la columna cromatográfica C1.

La columna 4 contiene 15g de silica gel y se purificaran la unión de la fracción 22 de la columna 1 C1, es una columna isocrática el solvente de elución es Acetato de etilo: Metanol (19.5:0.5), volúmenes de 10 ml, se realiza porque en la TLC 1 presenta eficiencia, pero no tiene buena eficacia, lo que implica que no tiene resolución, presentan R_f. de 0.07, 0.09, 0.16, 0.22 y 0.45, se recolecto 8 fracciones.

TABLA 7-2 FRACCIONES OBTENIDAS SEGÚN EL ELUYENTE UTILIZADO EN LA MICROCOLUMNA DE LA FRACCIÓN 22.

SOLVENTE	PROPORCION	FRACCIONES
Acetato de etilo: Metanol	19.5:0.5	1,2,3,4,5,6,7,8

2.13.1 Determinación cromatográfica de las fracciones de microcolumna de la fracción 22.

Para verificar la presencia de metabolitos, reunir fracciones y purificar se cromatografían en capa fina como se indica a continuación.

2.13.1.1 Verificación de la presencia de metabolitos en la fracción 2, 3, 4, 5 y 6.

Se procedió a realizar la capa fina, como solvente de corrido se utilizó Acetato de etilo: Metanol (19.5:0.5) y como revelador Sulfato de serio, con la finalidad de evidenciar la separación y purificación de los metabolitos secundarios de estas fracciones.

2.13.1.2 Verificación de la pureza de la fracción 3 y 4 de la columna C4

Por lo que tenemos en la fracción 3 y 4 la presencia de una sola mancha redonda en el frente del solvente con sus Rfs diferentes, por lo cual tenemos los compuestos puros (II) y (III).

2.14 Separación y purificación del subextracto toluenico del extracto etanólico

2.14.1 Separación del purificación del subextracto toluenico del extracto etanólico

Las condiciones cromatográficas del subextracto toluenico del extracto del extracto etanólico corrido con Hexano: Acetato de etilo para replicar en columna C1, se tomó 1 alícuota de 10 ml (9.70g) del subextracto toluenico y se colocó en la parte superior sobre la superficie de la silica que son 60g en la columna, se inicia la elución recolectando fracciones de 20ml, en este caso no hubo la formación de bandas, por lo cual permitió coleccionar varias fracciones. Se inició la elución con Hexano, recogiendo 1-3, y se observó que la mancha no descendía, por lo cual ya no existía se aumentó la polaridad de la 4 a la 13 Hexano: Acetato de etilo (7:3), de la fracción 14 a 17 colocamos Hexano: Acetato de etilo (6:4), continuamos solo con Acetato de etilo (100) en las fracciones 18 a 28, como en la columna no se diferencia nada ponemos Acetato de etilo: Metanol (9:1),

en las fracciones 29 a 36, en las fracciones 37 a 38 se puso Acetato de etilo: Metanol (50:50) y finalmente Metanol (100) en las fracciones restantes.

TABLA 8-2. FRACCIONES OBTENIDAS DEL SUBEXTRACTO TOLUENICO DEL EXTRACTO ETANOLICO, SEGÚN EL ELUYENTE UTILIZADO

SOLVENTE	PROPORCION	FRACCIONES
Hexano	100	1,2,3
Hexano : Acetato de etilo	7:3	4,5,6,7,8,9,10,11,12,13
Hexano : Acetato de etilo	6:4	14, 15, 16, 17
Acetato de etilo	100	18,19,20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
Acetato de etilo :Metanol	9:1	29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36
Acetato de etilo :Metanol	50:50	37, 38
Metanol	100	39, 40, 41, 42

- Cada franja que se obtienen se recolecta en recipientes individuales. (CC)

2.14.2 Determinación cromatográfica de las fracciones de columna.

Las 42 fracciones recolectadas tienen tonalidades diferentes, lo cual nos ayuda para determinar la presencia de compuestos, reunión de fracciones y purificación de las mismas se muestrean por aspecto, color y cantidad de solvente eluido.

2.14.2.1 Comprobación de la presencia de metabolitos en las 42 fracciones

Se realizó la cromatografía en capa fina de estas fracciones para identificar la presencia de metabolitos secundarios y su grado de pureza, por lo que se procedió a realizarla con Acetato de etilo: Ácido Acético: Acido Fórmico: Agua (100:11:11:26), las mismas que se revelaron en primer lugar con vapores de amoniaco, y luego con Ce SO_4 .

2.14.2.2 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones unidas 34 a 38.

Despues de realizar la union de algunas fracciones, se procedio a realizar una microcolumna cromatografia de las mismas, para recuperar el primer compuesto que nos dio la mancha amarilla, se empezo con Acetato de etilo (100), luego, Hexano: Acetato

de etilo (8:2), se continuo con Hexano: Acetato de etilo (1:1) y finalmente so coloco Acetato de etilo: Metanol (5:1).

2.14.2.3 Verificación de la presencia de metabolitos en la unión de la fracción 34 a 38.

Se procedió a realizar la capa fina, como solvente de corrido se Acetato de etilo: Ácido Acético: Acido Fórmico: Agua (100:11:11:26) y como revelador **Ce SO₄·**, con la finalidad de evidenciar la separación y purificación de los metabolitos secundarios de estas fracciones.

TABLA 9-2. ABSORBANCIA Y LONGITUDES DE ONDA DE LOS CRISTALES DE LA FRACCIÓN 13 C2 OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA UV.

Absorbancia (Abs)	Longitud de onda (λ) nm
2.888	410 nm

TABLA 10-2. ABSORBANCIA Y LONGITUDES DE ONDA DE LOS CRISTALES DE LA FRACCIÓN 31 OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA UV.

Absorbancia (Abs)	Longitud de onda (λ) nm
3.059	418nm
1.903	428nm

TABLA 11-2. ABSORBANCIA Y LONGITUDES DE ONDA DE LOS CRISTALES DE LA FRACCIÓN 43 OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA UV.

Absorbancia (Abs)	Longitud de onda (λ) nm
3.099	417 nm

2.14.2.4 Verificación de la pureza de las fracciones unidas de 34 a 38.

Esta placa cromatografía nos indica que la fracción 4 de la unión de 34 a 38 de la primera columna realizada presenta una sola mancha amarilla en la parte superior del corrido del solvente, razón por la cual se presenta como compuesto puro el I de este subextracto toluenico, las manchas de las fracciones 6 a 9 son las mismas y de la misma forma se presenta una sola razón por la cual se procedió a unirlas, por lo tanto es el II compuesto

puro, la fracción 10 y 13 son compuestos puros ya que tienen una sola mancha pero sus R_fs son diferentes por lo cual en esta fracción tenemos 4 compuestos puros.

2.15 Separación y purificación del subextracto butanolico extraído de la fase acuosa

2.15.1 Separación y purificación del subextracto butanolico extraído de la fase acuosa

Las condiciones cromatográficas del subextracto butanolico del extracto del extracto etanólico corrido con Acetato de etilo: Ácido Acético: Acido Fórmico: Agua (100:11:11:26), para replicar en una columna cromatográfica, se tomó 1 alícuota de 10 ml (9.70g) del subextracto butanolico y se colocó en la parte superior sobre la superficie de la silica que son 60g en la columna, se inicia la elución recolectando fracciones de 20ml, en el caso de formarse bandas permitió coleccionar una fracción correspondiente a la finalización de la una e inicio de la otra., por lo cual permitió coleccionar varias fracciones. Se inició la elución con Hexano: Acetato de etilo (1:1), recogiendo 1-7, y se observó que la mancha no descendía, por lo cual ya no existía se aumentó la polaridad de la 8 a la 10 Hexano: Acetato de etilo (8:2), de la fracción 9 a 11 colocamos Acetato de etilo (100), continuamos solo con Acetato de etilo: Metanol (30:5) en las fracciones 12 a 14, como en la columna siguen franjas de colores pero ya no descienden se puso finalmente Metanol (100)

TABLA 12-2. FRACCIONES OBTENIDAS DEL SUBEXTRACTO BUTANOLICO EXTRAIDO DE LA FASE ACUOSA, SEGÚN EL ELUYENTE UTILIZADO

SOLVENTE	PROPORCION	FRACCIONES
Hexano : Acetato de etilo	1:1	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
Hexano : Acetato de etilo	8:2	8, 9, 10
Acetato de etilo	100	9, 10, 11
Acetato de etilo :Metanol	30:5	12, 13, 14
Metanol	100	15, 16, 17, 18

- Cada franja que se obtienen se recolecta en recipientes individuales. (CC)

2.15.2 Determinación cromatográfica de las fracciones de columna.

Las 18 fracciones recolectadas tienen tonalidades diferentes, lo cual nos ayuda para determinar la presencia de compuestos, reunión de fracciones y purificación de las mismas se muestrean por aspecto, color y cantidad de solvente eluido.

2.15.2.1 Comprobación de la presencia de metabolitos en las 42 fracciones

Se realizó la cromatografía en capa fina de estas fracciones para identificar la presencia de metabolitos secundarios y su grado de pureza, por lo que se procedió a realizarla con Acetato de etilo: Ácido Acético: Acido Fórmico: Agua (100:11:11:26), las mismas que se revelaron con **Ce SO₄**.

2.15.2.2 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones unidas

Se presentaron manchas que tenían eficiencia, resolución y eficacia por lo mismo al unir las muestras se obtuvo 5 muestras puras las mismas que fueron manchas amarillas en la parte superior de la placa.

2.15.2.3 Verificación de la presencia de metabolitos en la unión de la fracción

Se procedió a realizar la capa fina, como solvente de corrido Acetato de etilo: Ácido Acético: Acido Fórmico: Agua (100:11:11:26), las mismas que se revelaron con Ce SO₄, con la finalidad de evidenciar la separación y purificación de los metabolitos.

2.15.2.4 Verificación de la pureza de las fracciones unidas de 1 a 18.

Se unió la fracción de 1 a 6 las mismas que tuvieron Rfs muy similares, se dejó la 6 sola ya que presentó un color morado en la parte superior, la fracción 13 se dejó sola al igual que la 15 por presentar Rfs similares, sus manchas de color amarillo en diferentes tonalidades.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Análisis de la especie vegetal

3.1.1 Comprobación taxonómica e identificación botánica

La comprobación taxonómica e identificación botánica fue realizada por el curador del Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, el Ing. Jorge Caranqui, el mismo que reportó que se trata de un arbusto perteneciente a la familia *Melastomataceae*, género su nombre científico es *Miconia pseudocentrophora*, conocido comúnmente como colca cultivada en el bosque de San Francisco de Guallabamba cantón Chambo.

La recolección del vegetal se realizó de una sola planta en época de floración y fue identificada taxonómicamente, *Miconia pseudocentrophora*

La muestra debe ser eliminada de todo tipo de contaminante microbiológico, otros vegetales, tierra; que pueden variar la composición real presente en estos vegetales.

3.2 Obtención del extracto etanólico.

El proceso de maceración de una muestra primero troceada y luego licuada para tener un tamaño de partícula ni muy fino ni muy grueso que ayuda en el fenómeno de osmosis o ingreso del solvente al interior de la célula (engonfiamiento o inchamiento), de la misma y estallido dejando en el solvente los metabolitos secundarios. Por el proceso de decantado se separan el líquido y deja el sólido que constituye el residual vegetal que puede ser remacerado o eliminado.

El líquido de decantación debe ser evaporado a presión reducida para evitar la degradación de algún compuesto por efecto del calor o la salida de los aceites los esenciales; la reducción a 1 octavo de volumen permite que esté el agua del vegetal fresco en la cantidad ideal para solubilizar los metabolitos secundarios y por enfriamiento en refrigeración durante 12 horas se observa la precipitación de la clorofila en la solución. La clorofila pigmento verde que en la parte aérea se encuentra en gran cantidad influye en las reacciones de identificación química de grupos fitoquímicos, al estar constituidos por anillo pirrol dan positivas las reacciones para alcaloides, también influyen en el

proceso de fraccionamiento sea liquido- liquido, solido- liquido porque incluye a los metabolitos en forma de complejos.

3.3 Análisis de los extractos

3.3.1 Determinación de las características organolépticas y físicas del extracto etanólico.

Las flores son de color blanco, y abundantes hojas verdes por lo tanto el extracto total es de color verde oscuro intenso y una vez eliminado los pigmentos verdes se obtiene un líquido-marrón turbio, lo cual nos permite determinar las propiedades físicas y químicas de la solución que contiene los metabolitos secundarios, la densidad de 0.97g/ML, nos indica que es más liviano que el agua, el olor endulzante la presencia de azúcares y el sabor amargo pueden ser terpenos.

Los resultados se reportan en el cuadro.

TABLA 13-2. CARACTERISTICAS ORGANOLÉTICAS Y FISICAS DEL EXTRACTO ETANOLICO.

Peso muestra	1kg
Aspecto	Líquido
Consistencia	Turbio
Color	Marrón
Olor	Endulzante
Sabor	Amargo
pH	3.43
Índice de refracción	1.346
densidad	0.97 g/mL

3.3.2 Análisis fisicoquímicos cualitativo mediante reacciones de caracterización.

Los resultados obtenidos a partir de reacciones de coloración o precipitación del tamizaje fitoquímico se aprecian en la siguiente tabla:

TABLA 14-2 CARACTERISTICAS QUIMICAS DEL EXTRACTO ETANOLICO.

Prueba	Metabolito	especificación	Resultado
FeCl ₃	fenoles	Coloración rojo vino(compuestos fenólicos en general Coloración verde intensa(taninos de tipo pirocatecol) Coloración azul(taninos del tipo pirogalotan)	Azul
Shinoda	Extracto alcohólico incoloro o ligeramente amarillo, presencia de flavonas y flavonoles va de amarillo a rojo Flavonoles de rojo a magenta Flavanonas rojo a magenta, violeta, azul Isoflavonas amarillo Isoflavononas, chalconas y auronas no dan color	Coloración amarillo, naranja, carmelita o rojo intenso en todos los casos flavonoides.	Amarillo
Dragendorff	Alcaloides	Opalescencia+ turbidez++ Precipitado+++ Anaranjado o pardo anaranjado	Precipitado naranja(+++)
Baljet	Compuestos con agrupamiento lactónico.	Precipitado anaranjado a rojo+ Opalescencia+ turbidez++ Precipitado+++	Café Precipitado+++ (-)
Borntrager	Quinonas	Coloración rosado naftoquininas) Anaranjado (benzoquinonas) Violeta (antroquinonas)	rojo
Liebermann- Burchard	Triterpenos y/o esteroides	Anillo en la interface de color verde y celeste	Anillo celeste
Saponinas	Triterpenos y/o esteroides	Espuma en forma de panal de abejas en la superficie del líquido de más de 2ml de altura y persistente por más de 2 minutos	Persistente por 3 min.
Fehling	Azucares reductores	Solución de color rojo o aparece precipitado rojo.	Color roja(+)

En la prueba de benedic (FeCl₃) da un precipitado azul que indica la presencia de taninos pirogálicos.

Una de las reacciones de derivados fenólicos es la de shinoda que dio color amarillo por lo cual puede tratarse de isoflavonas

Baljet la reacción está fundamentada en la formación de picratos de color anaranjado que en medio básico es característico para la presencia de anillo lactónico, el mismo que está presente en sesquiterpenos lactonas, en cumarinas, y algunos limonoides, el pardo anaranjado que da como resultado puede ser por asociación de dos grupos con este anillo lactónico.

Borntrager es la reacción que caracteriza a las quinonas y el color rojo anaranjado es característico de la presencia de posibles benzoquinonas

Liebermann- Burchard se caracteriza esta reacción por tener un reactivo oxidante formado por cloroformo y ácido sulfúrico la presencia del anillo verde oscuro en la interface indica la presencia de triterpenos y/o esteroides

Saponinas para esta reacción el agua agregada permite la formación de espuma que dura por más de dos minutos y relacionando con la reacción de Lieberman existe la posibilidad de la presencia de saponinas que pueden ser triterpénicas o esteroideas.

Fehling esta reacción se basa en la oxidación de los azúcares y la reducción del cobre se obtiene como resultado el color rojo que indica la presencia de azúcares reductores el resultado es consecuente con el olor azucarado del extracto total.

3.4 Separación y purificación de metabolitos secundarios de Colca (*Miconia pseudocentrophora*).

Para la posible identificación de los metabolitos secundarios presentes en la Colca se procedió al análisis cromatográfico, el cual permitió aislar compuestos puros para su determinación espectrofotométrica.

3.4.1 Separación y purificación del extracto etanólico.

Para identificar en el contenido la presencia de metabolitos secundarios que ya determinados en el tamizaje fitoquímico y que dio positivo para cumarinas, taninos, y de mayor evidencia, flavonoides y triterpenos, se probó las cromatografías en: Hexano: Acetato de Etilo (6:4), y en Acetato de etilo: Metanol (19.5:0.5) las cuales presentaron manchas. (TLC 1)

3.4.2 Separación y purificación del extracto en columna

Las condiciones cromatográficas del extracto etanólico corrido con hexano acetato de etilo para replicar en columna C1, se tomó 1 alícuota de 10 ml (9.70g) del extracto etanólico y se colocó en la parte superior sobre la superficie de la sílica que son 60g en la columna, se inicia la elución recolectando fracciones de 20ml, en el caso de formarse bandas permitió coleccionar una fracción correspondiente a la finalización de la una e inicio de la otra. Se inició la elución con hexano, recolectándose 1-5, y se observó que la coloración amarilla ya no existía por lo cual se aumentó la polaridad de la 6 a la 15 Hexano: Acetato de etilo (6:4), de la fracción 16 a 20 Acetato de etilo: Metanol (19.5:0.5), y finalmente Metanol en las fracciones restantes.

3.4.2.1 Comprobación de la presencia de metabolitos en las 27 fracciones

Se realizó la cromatografía en capa fina de estas fracciones para identificar la presencia de metabolitos secundarios y su grado de pureza, por lo que se procedió a realizarla con Hexano: Acetato de etilo (6:4), las primeras 14 fracciones, las mismas que se reveló con Rosentaler, desde la fracción 15 a la 27 se procedió a realizar con Acetato de etilo: Metanol (19.5:0.5) y se reveló con Sulfato de Cerio.

La cromatografía de las fracciones 1 a 5 corridas con Hexano: Acetato de etilo (6:4) y reveladas con Rosentaler: en la fracción 1 da un compuesto anaranjado de Rf. 7.3. La fracción 2 presenta compuestos rojos y violetas de Rf. 5, 6.5, 7.2, 8.1, la fracción 3 tiene un compuesto rojo y sobrepuesto un compuesto rojo y violeta con Rf. 6.5 y 7, la fracción 4 tiene dos compuestos violetas con Rf. 6.8 y 7.2, finalmente la fracción 5 tres compuestos violetas con Rf. 5.5, 7.5 y 8.2, los compuestos violetas indican la presencia de terpenos y en el caso de una sola mancha pueden estar puros, si las manchas son de diámetro grande indican mayor cantidad y diámetros pequeños pequeña cantidad.

La 7 y la 8 son las mismas la 9 está en mínima cantidad y es otro compuesto, 10 casi no se ve por lo tanto la 11 presenta compuestos similares a la 13 y la 14 ya no se desplaza se queda en el punto de aplicación

Las fracciones 6, 7 y 8 al revelarse con Rosentaler indican que contienen compuestos con Rf. similares, mientras que la 9 está en mínima cantidad, la fracción 10 no contiene compuestos la fracción 11 tiene tres compuestos pegados a la base o aplicación, la fracción 12 no presenta terpenos y la fracción 13 es similar a la 11.

La fracción 15 posiblemente es una mezcla de dos grupos fitoquímicos diferentes por cuanto el color violeta es característico de terpenos, mientras el color anaranjado pueden ser flavonoides y serán necesario aumentar la polaridad del solvente de corrido y revelar con Sulfato de cerio para determinar la presencia o ausencia de flavonoides. En las fracciones de 16 a 19 la mancha de diámetro grande y de color violeta con el reactivo de Rosentaler indica la presencia de terpenos que deberán realizarse cromatografías con aumento de polaridad revelados con sulfato de cerio para observar si existen más de los terpenos derivados fenólicos. Las fracciones 20 a 26 contienen terpenos por su coloración violeta al estar de solvente Acetato de etilo y Metanol pueden tratarse de saponinas pero debe analizarse la presencia de flavonoides, y la fracción 27 se la deja sola por su color amarillo intenso que en este se presenta.

Por lo tanto unimos las fracciones 2,3,4, luego la fracción 5 y 6, unimos 7, 8, 9, 10, se une 11 y 12, 13 14 y 15 las dejamos solas por las manchas que estas presentan, se une 16 y 17, luego se une de la fracción 19 a la fracción 26, y la fracción 27 la dejamos sola.

3.4.2.2 Separación de las fracciones unidas 2, 3 y 4 de Columna 2 más la fracción 6 de Columna C2 en Columna C1.

Se procedió a realizar la capa fina, como solvente de corrido se utilizó Hexano: Acetato de etilo (8:2) y como revelador Rosentaler, con la finalidad de evidenciar la separación y purificación de los metabolitos secundarios de estas fracciones.

3.5 Verificación de la pureza de la fracción 0 de C3

La fracción 0 de la columna C3, presenta una sola mancha en la parte superior de la placa de color amarilla la misma que puede ser la presencia de un terpeno, y con su R_f , 0.35, por lo que decimos que estamos en la presencia del compuesto puro (IV).

3.6 Verificación de la pureza de la unión de las fracción 2, 3, 4, 5, 6 y 7 de C3

Estos compuestos presentaron todos la misma mancha con el frente del solvente del mismo color amarillo, sus R_f s similares por lo tanto unimos estas muestras e hicimos una sola, la misma que nos da el compuesto (VI) puro.

3.7 Placas de las cromatografías en capa fina (TLC) y columna cromatográfica (CC).

3.7.1 Placa cromatográfica del extracto etanólico

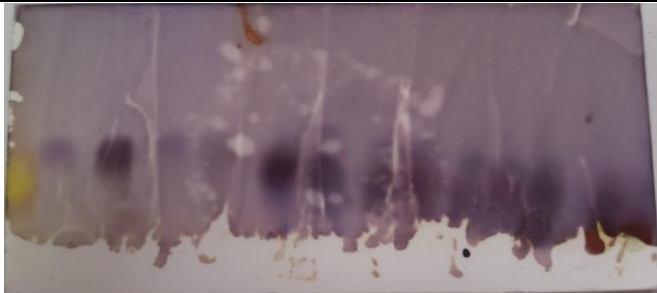
3.7.1.1 Separación del extracto en columna (CC1).




Se tuvo una separación en franjas las mismas que presentaban unos colores vistosos en tonalidades de amarillos.


Esta fue la principal columna ya que se utilizó una mezcla de solventes constituidos por Hexano, Acetato de etilo, Metanol, lo cual permitió la separación de la columna en franjas.

3.7.1.2 Placas cromatográficas de las 27 fracciones

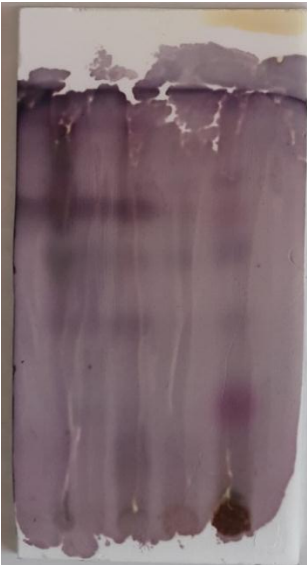

TLC 2			
Placa de sílica gel G_{F254}			
Solvente de corrido		Acetato de etilo: Metanol (19.5:0.5)	
Revelador		Sulfato de Cerio	
			
Fracción	Rf	Fracción	Rf
15	0.11	22	0.12
	0.15		0.14
	0.36		0.13
16	0.06	23	0.22
	0.36		0.30
	0.11		
	0.22		
	0.36		
17	0.06	24	0.23
	0.10		0.31
	0.13		0.33
	0.22		0.37
	0.38		0.47
	0.22		
	0.36		
18	0.06	25	0.31
	0.10		0.33
	0.13		0.37
	0.22		0.47
	0.41		0.53
19	0.06	26	0.45
	0.10		0.53
	0.13		0.55
	0.22		0.57
	0.41		0.61
	0.35		0.45
20	0.37	27	0.47
	0.46		0.53
	0.53		0.55

TLC 1			
Placa de sílica gel G_{F254}			
Solvente de corrido		Hexano: Acetato de etilo (6:4)	
Revelador		Rosental	
			
Fracción	Rf	Fracción	Rf
1	0.10 0.13 0.22 0.38	8	0.11 0.13
2	0.06 0.11 0.22 0.36	9	0.12 0.14
3	0.06 0.10 0.13 0.22 0.38	10	0.13 0.15
4	0.06 0.10 0.13 0.22 0.41	11	0.11 0.13
5	0.06 0.10 0.13 0.22 0.41	12	0.13 0.15
6	0.10 0.13 0.22 0.38	13	0.15
7	0.10 0.13 0.22 0.38	14	0.14

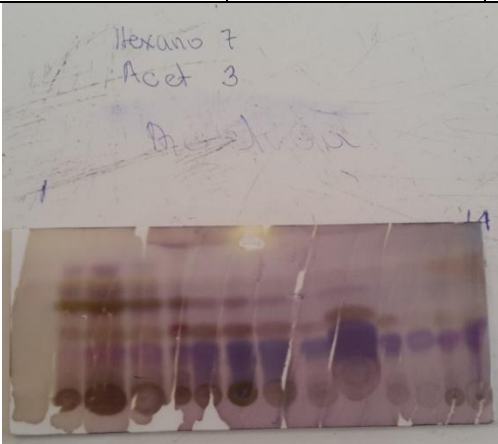

3.7.1.3 Placas cromatográficas de TLC3

TLC 3	
Placa de sílica gel <i>G_{F254}</i>	
Solvente de corrido	Hexano: Acetato de etilo (8:2)
Revelador	Sulfato de Cerio
	
Fracción	R _f
1	
2	0.06 0.11 0.22 0.36
3	0.06 0.10 0.13 0.22 0.38
4	0.06 0.10 0.13 0.22 0.41
5	0.06 0.10 0.13 0.22 0.41
6	0.07 0.09 0.16 0.22 0.45


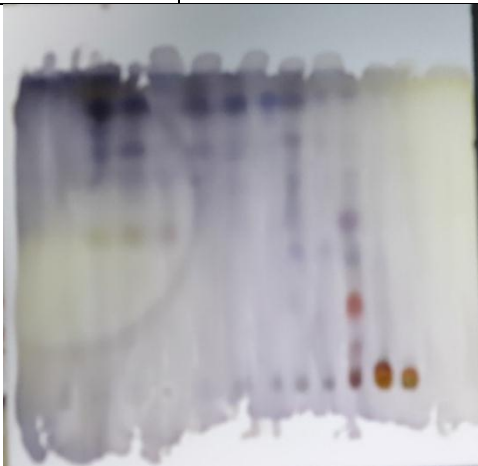
3.7.1.4 Placas cromatográficas de TLC4, TLC5

TLC 4		TLC 5	
Placa de sílica gel G_{F254}		Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Acetato de etilo 18.5 : Metanol 1.5	Solvente de corrido	Acetato de etilo 18.5 : Metanol 1.5
Revelador	Sulfato de Cerio	Revelador	Sulfato de Cerio
			
Fracción	Rf	Fracción	Rf
1	0.25	1	0.06 0.31
2	0.25	2	0.25
3	0.04 0.07 0.22	3	0.07 0.21 0.29
4	0.04 0.07 0.22	4	0.07 0.29
5	0.26	5	0.07 0.23 0.29
6	0.22		
7	0.04 0.23		

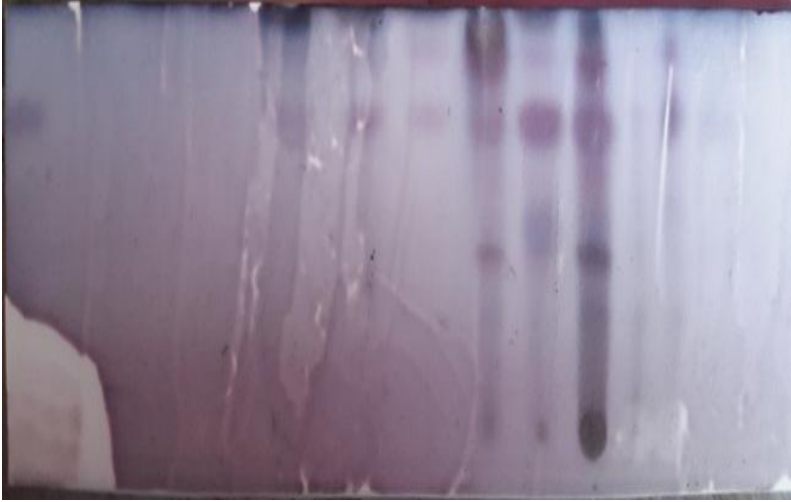
3.7.1.5 Placas cromatográficas de TLC6, TLC7


TLC 6		TLC 7	
Placa de sílica gel G_{F254}		Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente corrido de	Hexano 1: Acetato de etilo 1	Solvente corrido de	Hexano: Acetato de Etilo (8:2)
Revelador	Sulfato de Cerio	Revelador	Sulfato de Cerio
			
Fracción	Rf	Fracción	Rf
1	0.66	7	0.28 0.62 0.68
2	0.05 0.24 0.59	8	0.06 0.11 0.17 0.28 0.62 0.68
3	0.05 0.24 0.59	9	0.06 0.11 0.17 0.28 0.62 0.68
4	0.63	10	0.06 0.11 0.17 0.28 0.62 0.68
5	0.21 0.56 0.63	11	0.06 0.14 0.20 0.28
6	0.05 0.24 0.59	12	0.11

3.7.1.6 Placas cromatográficas de TLC6 Y TLC7


TLC 8				TLC 9	
Placa de sílica gel G_{F254}				Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido		Tolueno: Acetato de Etilo (80:20)		Solvente de corrido	
Revelador		Sulfato de Cerio		Revelador	
					
Fracción	Rf	Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia (Abs)	Fracción	Rf
1	0.85	203 nm	2.418	4	0.33
		276 nm	1.250		0.41
		331 nm	0.893		
2				5	0.28
					0.39
					0.48
3				6	
				7	0.28
					0.39
					0.48
				8	
				9	0.28
					0.39
					0.49

3.7.1.7 Placas cromatográficas de TLC10 Y TLC1



TLC 10	
Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	
Revelador	Sulfato de Cerio
	
Fracción	Rf
1	
2	0.06 0.11 0.15 0.22 0.32 0.98
3	
4	0.06 0.11 0.15 0.22 0.32 0.98
5	0.06 0.11
6	

TLC 11			
Placa de sílica gel G_{F254}			
Solvente de corrido		Hexano: Acetato de etilo (6:4)	
Revelador		Rosentaler	
			
Fracción	Rf	Fracción	Rf
1	0.13 0.32 0.43 0.82	11	0.13 0.19 0.35 0.52 0.65
2	0.27	14	0.08 0.16
3	0.26		
4			
5	0.26 0.39 0.49 0.61	17	0.08 0.19 0.35
		20	0.08 0.19

3.7.1.8 Placas cromatográficas de TLC12

TLC 12	
Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Acetato de etilo: Metanol(19.5:0.5)
Revelador	Sulfato de Cerio
	
Fracción	Rf
2	0.35 0.94
3	0.35 0.94
4	0.35 0.94
5	0.78 0.88
6	0.78 0.88
7	

3.7.1.9 Placas cromatográficas de TLC13 Y TLC14

TLC 13		TLC 14			
Placa de sílica gel G_{F254}		Placa de sílica gel G_{F254}			
Solvente de corrido	Acetato de etilo: Metanol (19.5:0.5)	Solvente de corrido	Acetato de etilo: Metanol (19.5:0.5)		
Revelador	Sulfato de Cerio	Revelador	Sulfato de Cerio		
					
Fracción	Rf	Fracción	Rf	Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia (Abs)
1	0.08 0.18	1	0.15	202 nm 225 nm 282 nm	1.721 0.742 0.459
2	0.08 0.16	2	0.10		
3	0.08 0.16	3	0.10		

Cada una de estas placas nos mostró manchas de diferentes Rfs, los cuales sirvieron para verificar si están presentes compuestos puros, los mismos que se determinan por sus diferentes características

3.7.2.0 Espectroscopias

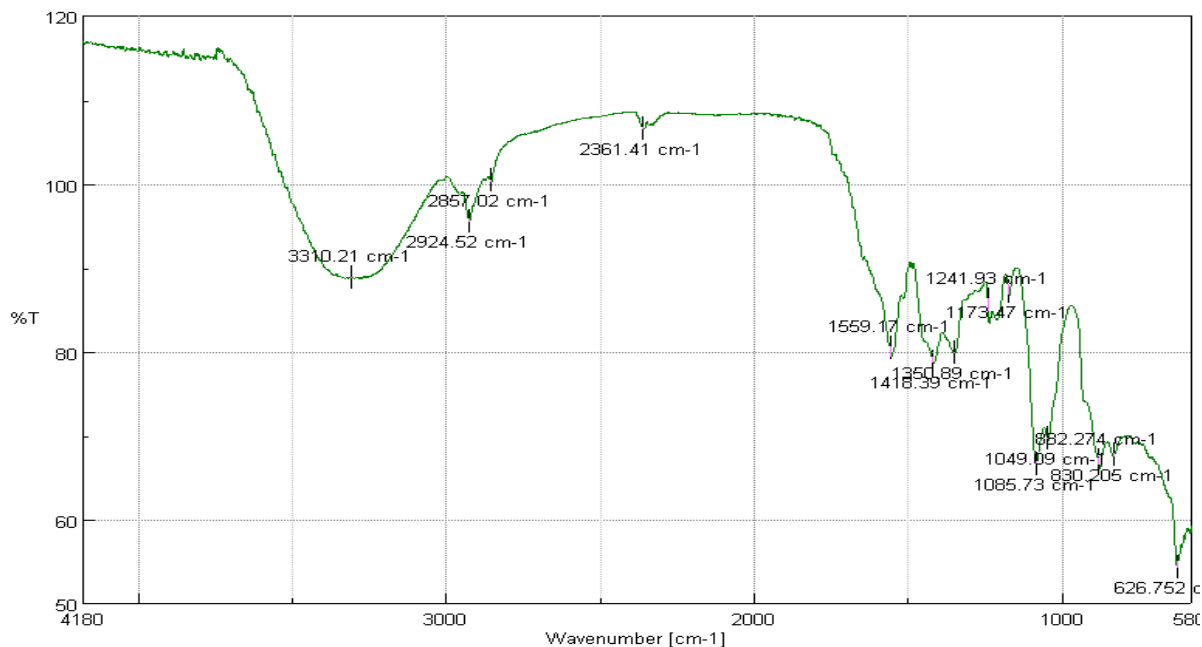


TABLA 15-3. VALORES OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA IR

3310.21	CH ₃
2924.52	CH ₂ ciclohexano alargamiento asimetrico
2857.02	CH ₂ ciclohexano alargamiento simetrico
2361.41	CH
1559.17	Anillo de 6 miembros
1241.93	CH
1173.47	CH
1350.89	CH
1416.39	CH
882.274	CH
1049.09	Oh ecuatorial
830.205	R-O-CH= CH ₂
1085.73	CH
626.752	CH

Característico de un compuesto con oh por la banda intensa a 3310.21 y las bandas complementarias de 1241 , y contiene grupos CH₃ CH₂ y ch por los valores de 2924,2857 y sus bandas complementarias son 882 y 830 y hay un doble enlace 1559 característico del anillo de 6 miembros y el CH 2 2857

Son saponinas porque nos da anillos de 6 miembros, los oh ecuatoriales, que se revelaron en sulfato de cerio y es característico de flavonoides.

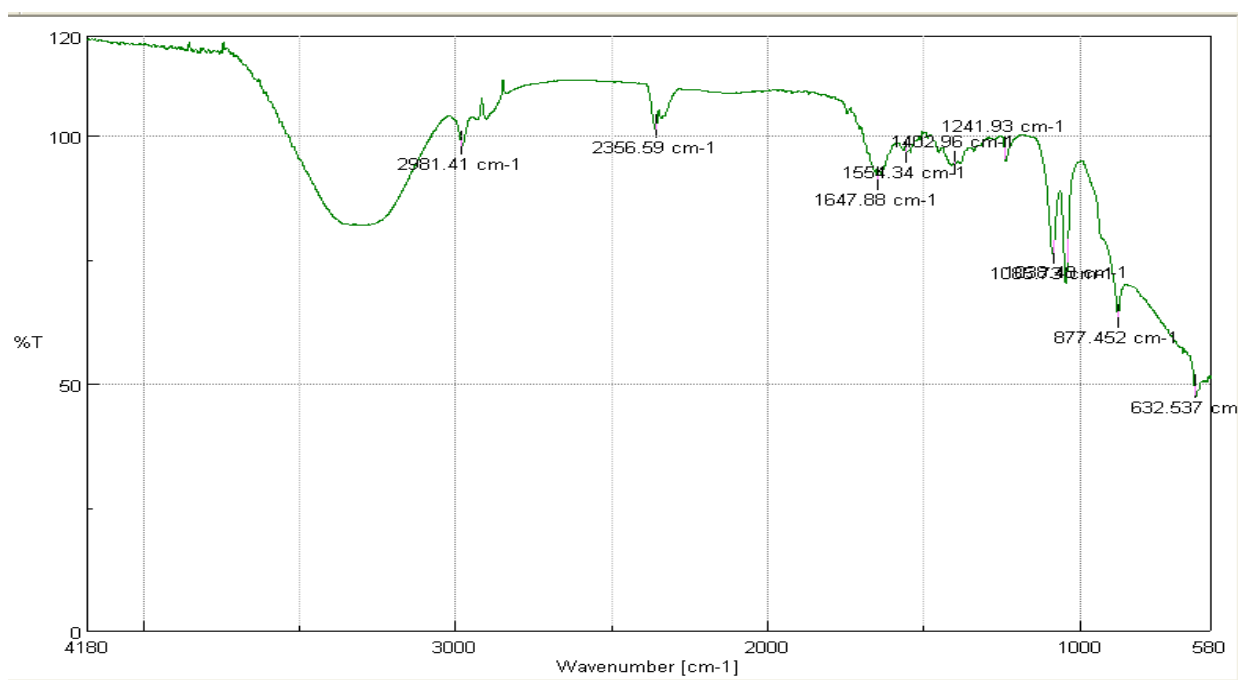


TABLA 16-3. VALORES OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA IR

2981.4	CH ₂
2356.59	CH
1554.34	Anillo de 6 miembros
1647.88	CH
1402.96	Instauración C ₂₀
1241.93	OH
877.47	Instauración C ₂₀
632.53	CH

En 3000 OH, 2981 de CH, 1647 de CO,

Es característico de un espectro de flavonoides por la presencia del oh a 3000 en 1600 la banda del doble enlace aromático, CO es la unión de carbono oxígeno.

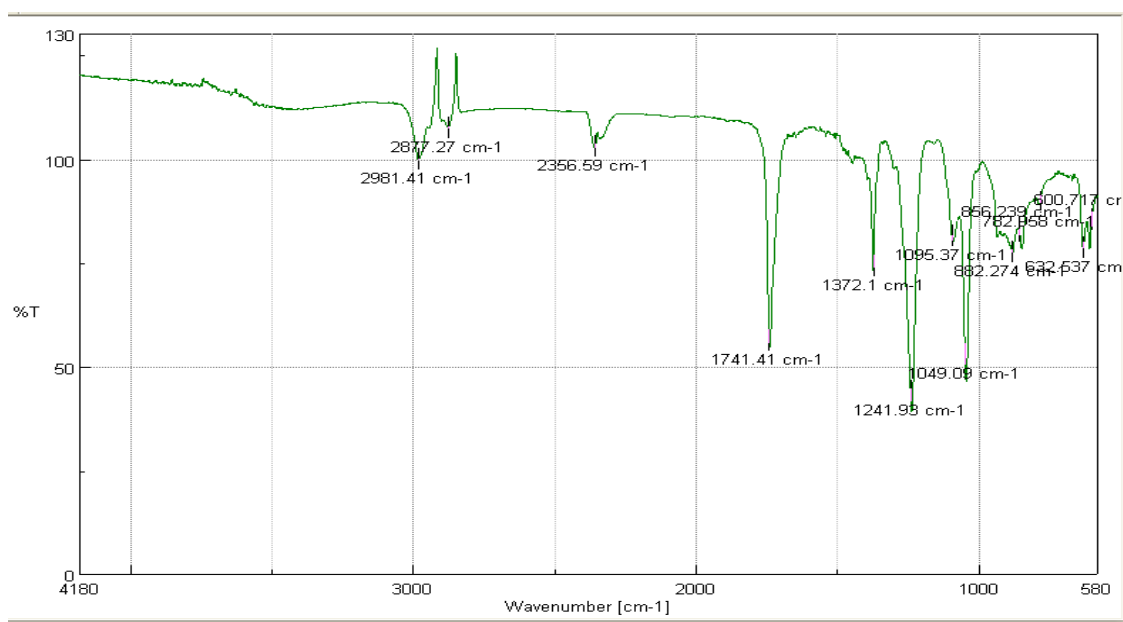


TABLA 17-3. VALORES OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA IR

2877.27	CH ₃
2981.41	CH ₂ ciclohexano alargamiento simetrico
2356.59	CH
1741.41	Ciclopentanona
1372.1	CH
1095.3	CH
1049.09	OH ecuatorial
1241.93	CH
856.239	Alargamiento de CH
782.95	CH
888.255	CH
600.17	CH
632.537	CH

La banda característica de 1741 es característica de un carbonilo o cetona en la posición 3 lo cual indica que se trata de un flavonoide con grupos metoxi.

La ausencia de la banda amplia en la posición de 3000 determina que el hidrogeno de los OH fenólicos están sustituidas por grupos metilos y se asumen que son flavonoides porque se revelan con sulfato de cerio.

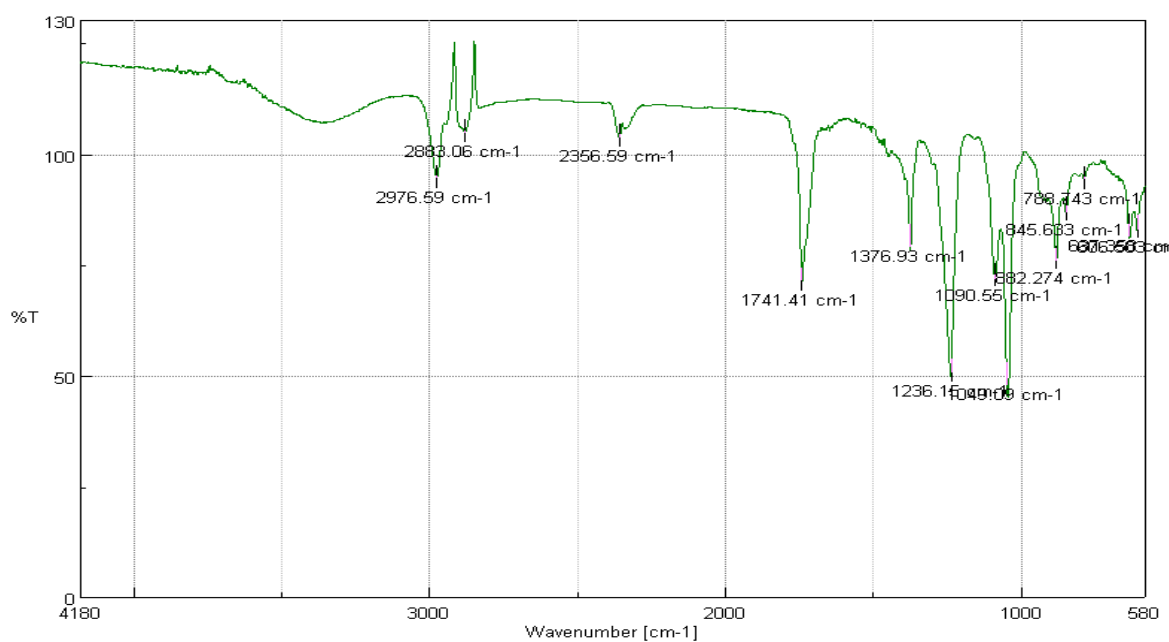


TABLA 18-3. VALORES OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA IR

2883.06	CH ₂ Alargamiento simetrico
2976.54	CH ₂ de anillo
2356.59	CH
1741.41	Oxilacion de valencia de carbonilo de 3 cetona(4nor 28-29 dinor)
1376.93	CH
1093.55	CH
1236.15	CH
1049.09	CH
1236.15	CH
1049.09	CH
882.274	CH
788.74	Carbonilo terceario ramificado
845.63	CH

Por los valores que presentaron se dice que puede ser un benzofurano.

Las bandas características de los benzofuranos son las de 1645 1605, se revelo con sulfato de cerio.

CONCLUSIONES

- El vegetal recolectado en el bosque de San Francisco de Guallabamba del cantón Chambo identificado en el herbario de la ESPOCH como (*Miconia pseudocentrophora*), se preparó el extracto etanólico y se separó, purifico los metabolitos secundarios terpenicos y flavonoides por lo cual la hipótesis es positiva.
- El vegetal, obtenido por el proceso de maceración estática y eliminado todo el solvente y clorofila da como aspecto líquido, de color marrón, sabor amargo del vegetal joven, olor endulzante, pH es de 3.43, densidad siendo de 0.97 g/ml; contiene flavonoides, terpenos.
- El fraccionamiento de 10 mL en columna de silica gel de fracciones de Hexano y Hexano: Acetato, se obtienen derivados terpenicos sólidos ligeramente coloreados de amarillo que dan bandas de 418nm y son posibles saponinas, las mismas que se corren en Cloroformo: Metanol : Agua (64:30:10), se revelan con vainillina, de las fracciones eluidas con Acetato de etilo: Metanol y Metanol puro se obtienen los posibles flavonoides, los mismos que dan de 4 a 5 bandas y que están entre 418 y 534nm, la cromatografía tienen un Rf:0.87, se corrió en de Acetato de etilo: Ácido fórmico: Ácido acético: Agua(100:11:11:26) , el color se intensifica con vapores de amoniaco y se observa al revelar con el sulfato de cerio los colores amarillos intensos.
- En la espectroscopia de I.R, se obtuvo un flavonoide metoxilado, ya que fue revelado con sulfato de cerio, por lo cual se complementara con el espectro U.V.
- También nos dio como resultado saponinas porque nos da anillos de 6 miembros, los OH ecuatoriales, que se revelaron en sulfato de cerio y es característico de flavonoides.
- Al momento se ha comprobado la pureza de los compuestos por cromatografía de capa fina y no se puede determinar la estructura porque no se dispone de resonancia magnética nuclear de hidrogeno y espectroscopia de masas.

RECOMENDACIONES

1. Se debe separar y purificar una cantidad representativa del extracto etanólico de Colca, el cual debe estar eliminado de clorofilas, ya que así se podrá tener mejores resultados de los metabolitos secundarios
2. Mantener todas las sustancias fuera de la incidencia de la luz y oxígeno para así poder evitar la degradación de los compuestos presentes y así tener resultados más reales.
3. Determinar la actividad biológica in vitro de los compuestos aislados.
4. Realizar las espectroscopias de HMNR, C^{13} , y la espectroscopia de masas para poder dar las posibles estructuras.
5. Realizar convenios con otras universidades en el caso de no ser posible la adquisición de equipos, materiales y reactivos, como el espectrofotómetro de masas o de resonancia magnética nuclear, ya que mediante estos se pueden obtener resultados más concretos, claros y específicos, así para tener un conocimiento más profundo del vegetal en estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. **CAMPBELL, P.** Bioquímica ilustrada. 5.ed. España. Elsevir. 2006. P. 199.
2. **CROMATOGRFÍA**
<http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/Thin.htm> (Mikhail Tswett. 2005)
<http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografiaThin.htm#historia> (Mikhail Tswett. 2005)
30-01-2015
3. **CUMANDÁ J.** Principios de Farmacognosia. CDR, Riobamba – Ecuador 2000, pp. 5.
4. **CUMANDÁ J.** Texto Básico de Farmacognosia. CDR, Riobamba – Ecuador 2004, pp. 16.
5. **EXTRACTO**
<http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/extractos/>
(Farmacognosia. 2010)
30-01-2015
6. **FITOMEDICINA: PRESENTE Y PASADO.**
<http://web.sinctis.com.ar/fitomedicina/Intrpfito.html>.(Edisan. 2004)
29-11-2014
7. **GATUSO, M.** Manual de procedimientos para el análisis de drogas en polvo. 2.ed. Italia. 1999. P.56
8. **LOCK O.** Manual de Fitoterapia. Fondo Editorial PUCP, 1994, pp. 20-44.
9. **LOS FITOFÁRMACOS**
http://www.nexusediciones.com/pdf/gine2005_1/gi-6-1-004.pdf (Enrique. 2008)
30-01-2015
10. **MACERACION**
<http://herbolaria.wikia.com/wiki/Maceraci%C3%B3n> (Robert G. 2010)
30-01-2015

11. MEDICINA TRADICIONAL.

<http://www.who.int/topics/medicine/areas/tradicional/en/index.html>. (Abu Dhabi. 2011)
29-11-2014

12. METABOLITOS SECUNDARIOS

<http://quimica.laguia2000.com/reacciones-quimicas/metabolitos-secundarios-de-las-plantas> (Jose.R. 2000)
30-01-2015

13. METODOS DE EXTRACCION

<http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/m%C3%A9todos-de-extracci%C3%B3n/> (Farmacognosia. 2010)
30-01-2015

14. **Roberts R. M.**, Modern Experimental Organic Chemistry, 3d. ed., Nueva York. 1979. pp. 3-10
http://organica1.org/1311/1311_6.pdf
27-12-2014

15. **MORALES, M. Y OTROS.** Plantas medicinales y Medicina natural. 2a.ed, Santiago de Chile-Chile. 2009, pp. 20-30

16. PLANTAS MEDICINALES

<http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/introduccion-a-la-farmacognosia/plantas-medicinales/> (Farmacognosia. 2010)
30-01-2015

17. PRINCIPIO ACTIVO

www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/farmacognosia/principio-activo/ (Jose.R. 2000)
30-01-2015

18. **RIOS, M., etal.** Plantas útiles del Ecuador. Quito – Ecuador. 2007, p.652

19. **SILVA, M Y OTROS.** Química de los triterpenos. Concepción – Chile. 1992, p.76.

20. SOLIS, P Y OTROS. Manual de caracterización y análisis de drogas vegetales y productos fitoterapéuticos, Panamá, 2005, pp. 43-57.

21. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

<http://farmacognosia-farmacauladech.blogspot.com/> (Maria Palacios. 2008)

22. VEROTTA V. Virtual activity real pharmacology, Milano-Italia. 1997, pp.50-60.

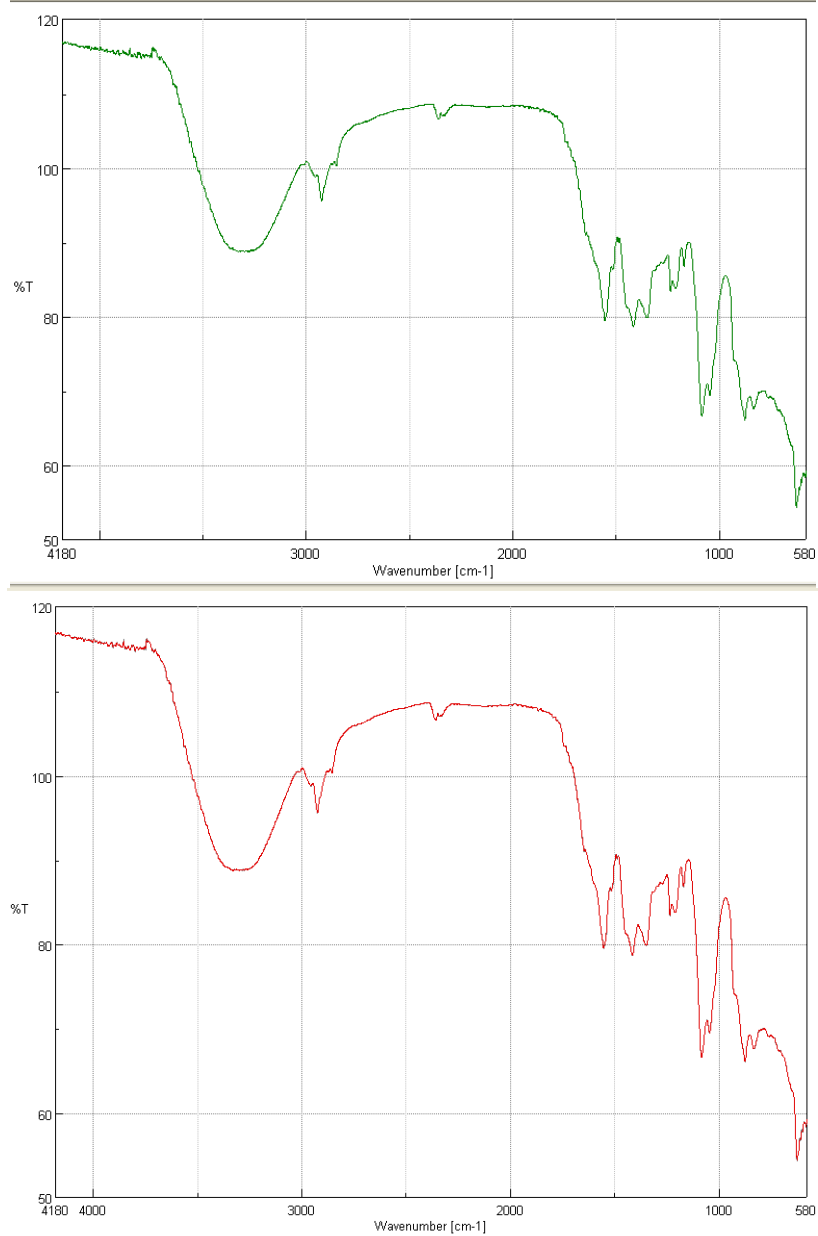
23. VALVERDE E., Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Cali-Colombia. 2000, pp.45.

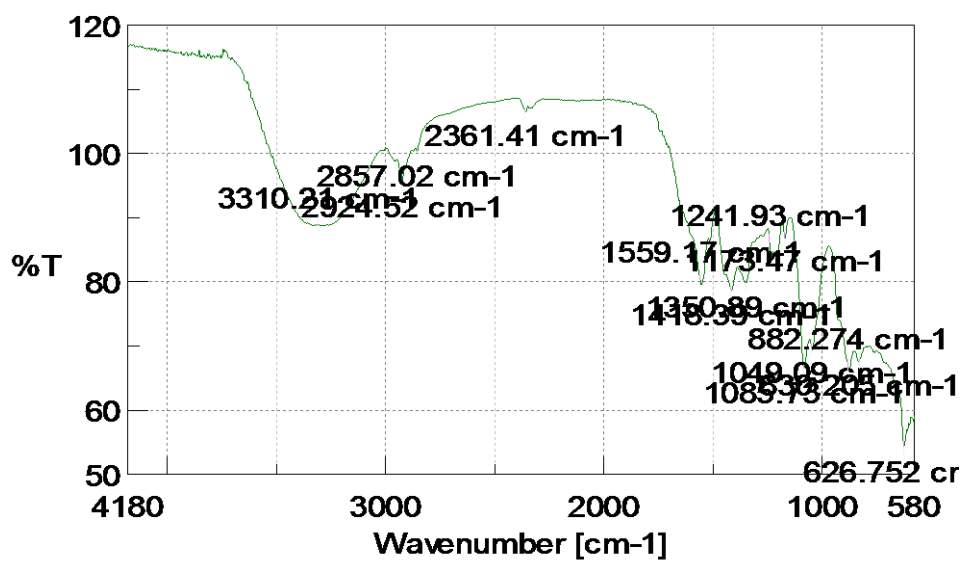
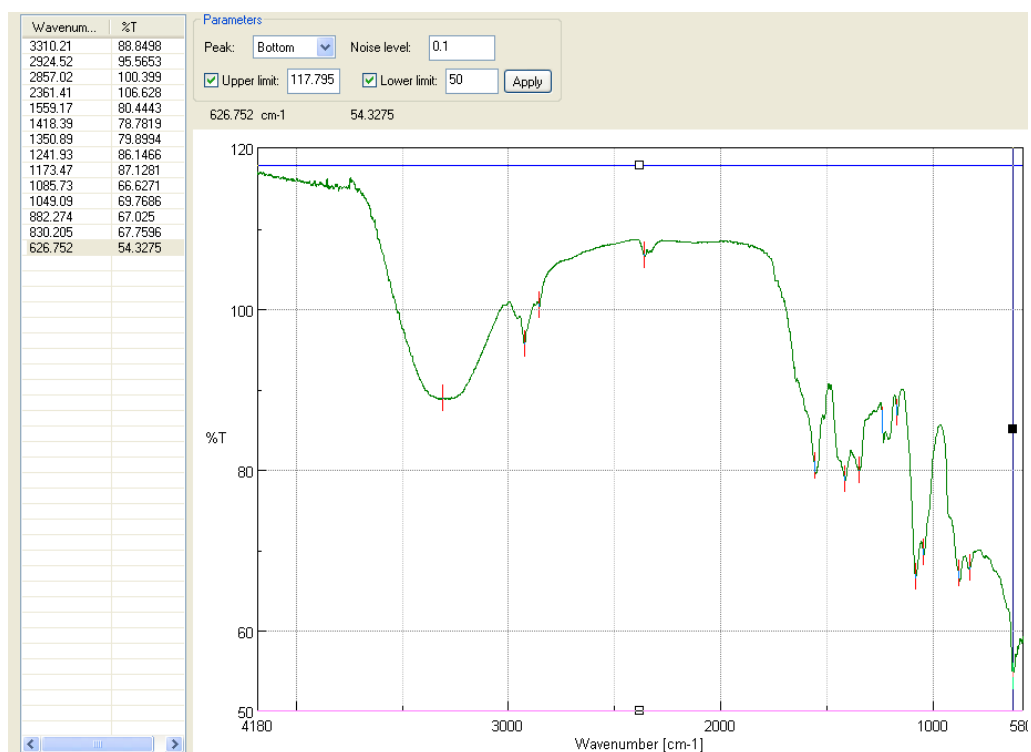
24. WAGNER H. Y BLADT S. Plant drug analysis. 2.ed. New York , 2010, p.60.

ANEXOS

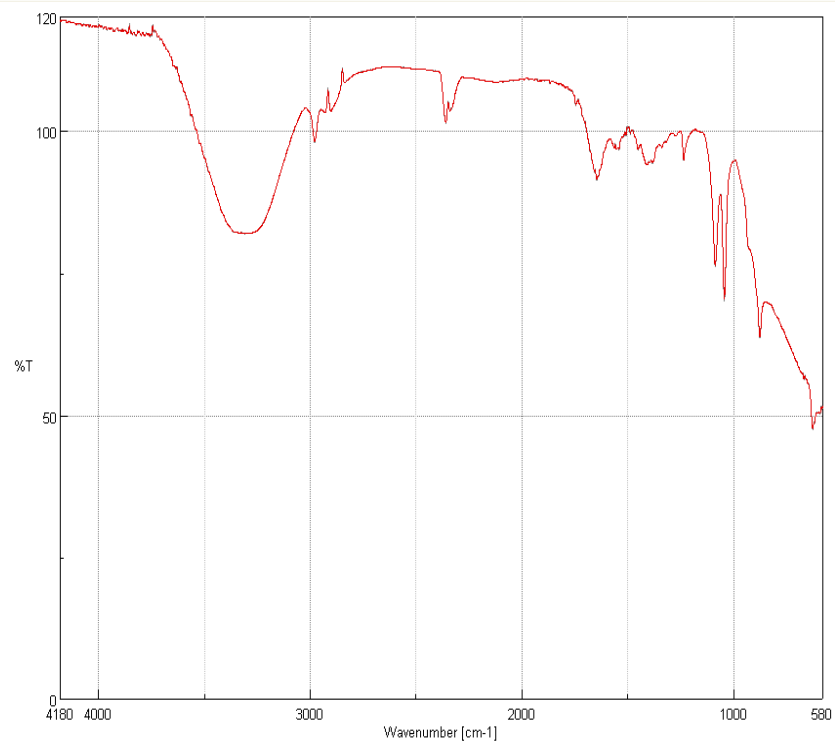
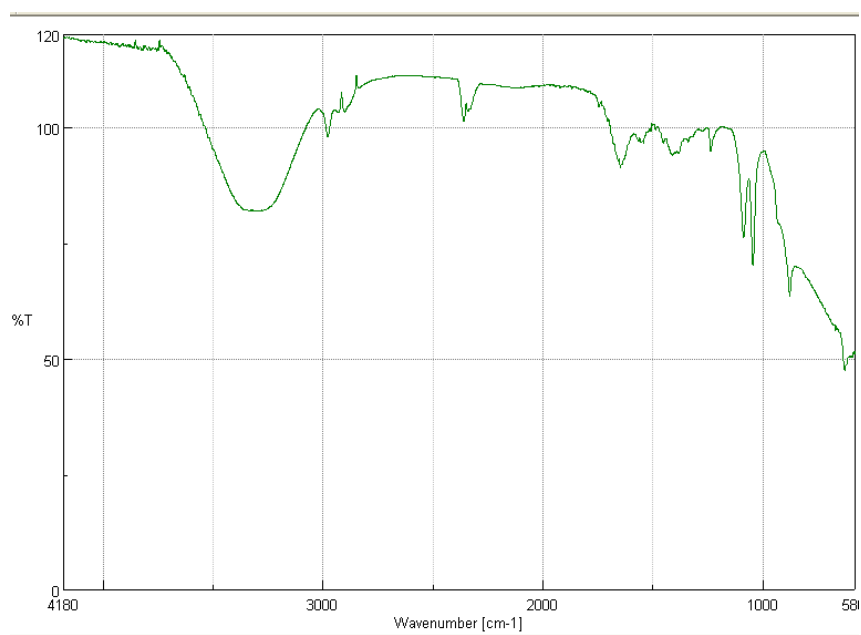
ESPECTRO DEL SUBEXTRACTO BUTANOLICO

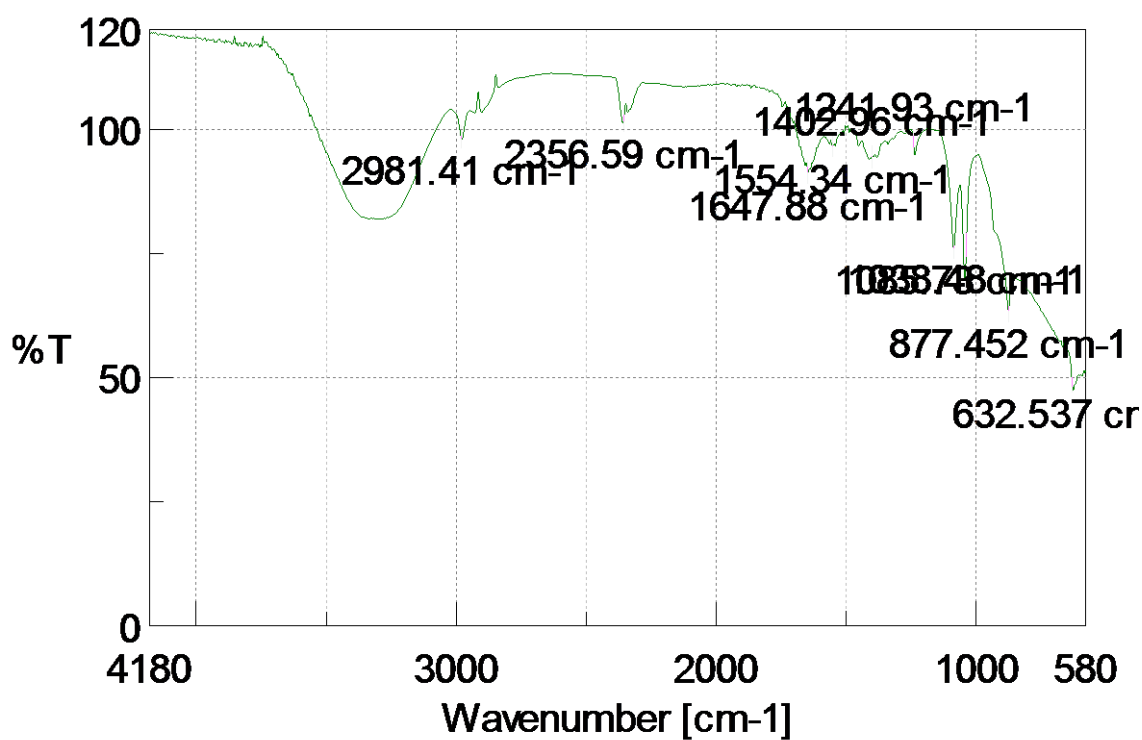
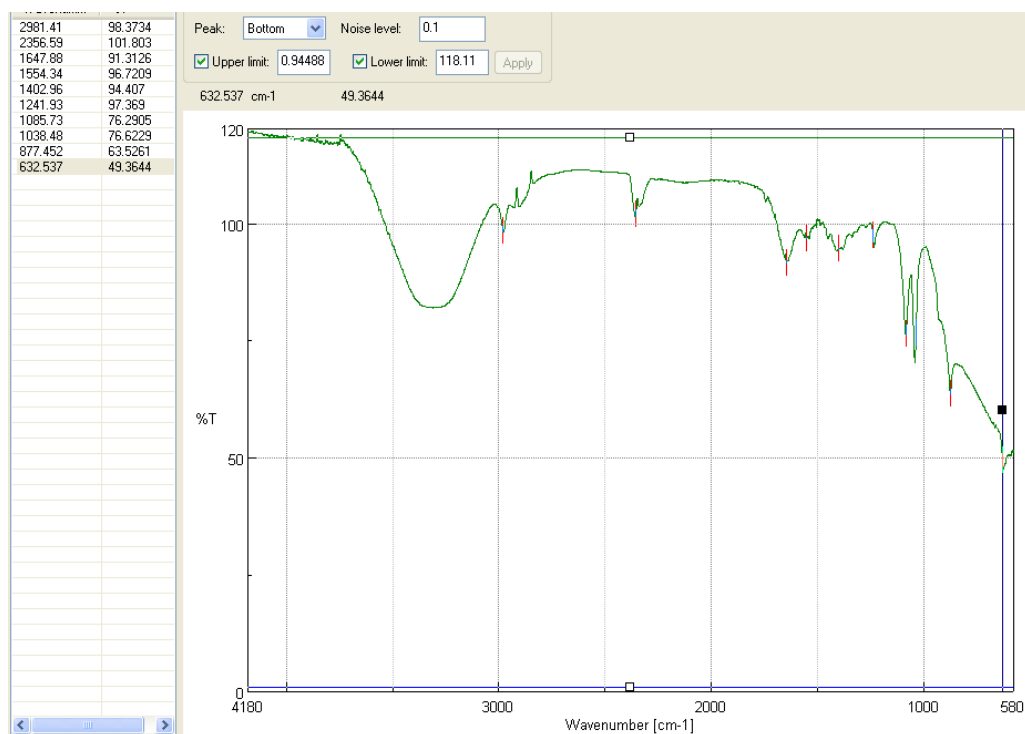
POSIBLES FLAVONOIDES FRACCIÓN 15



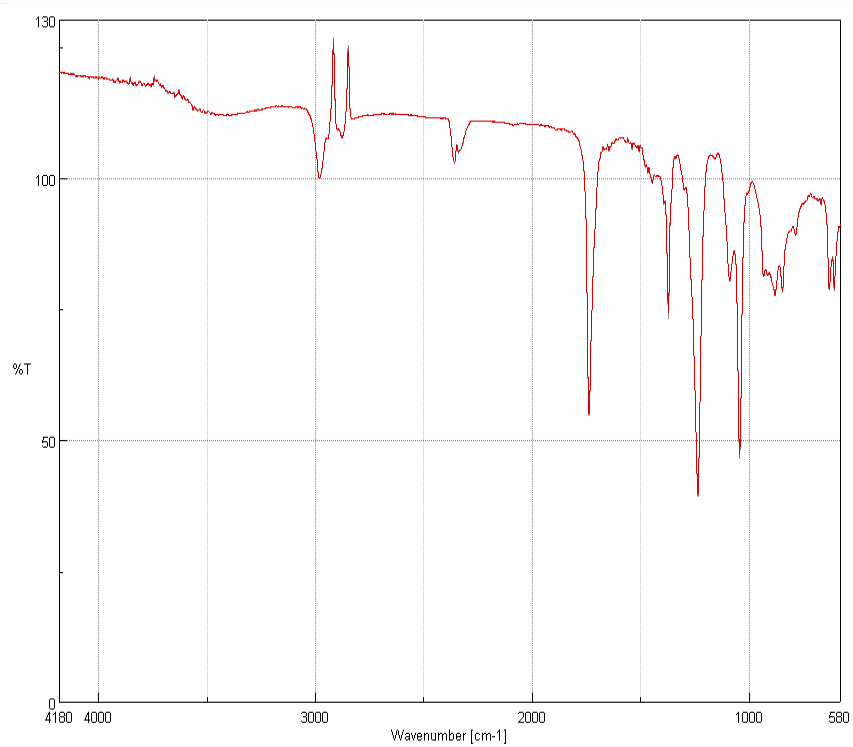
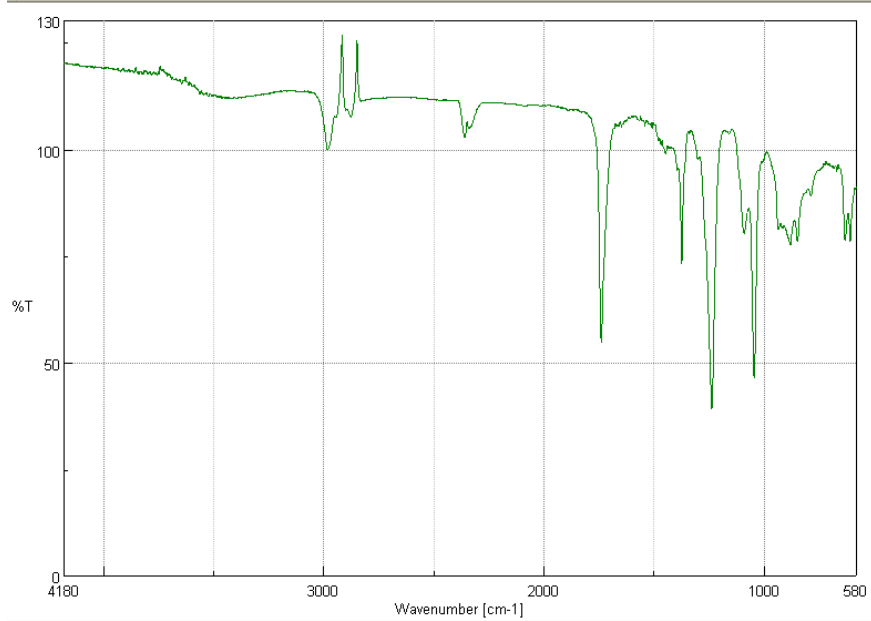


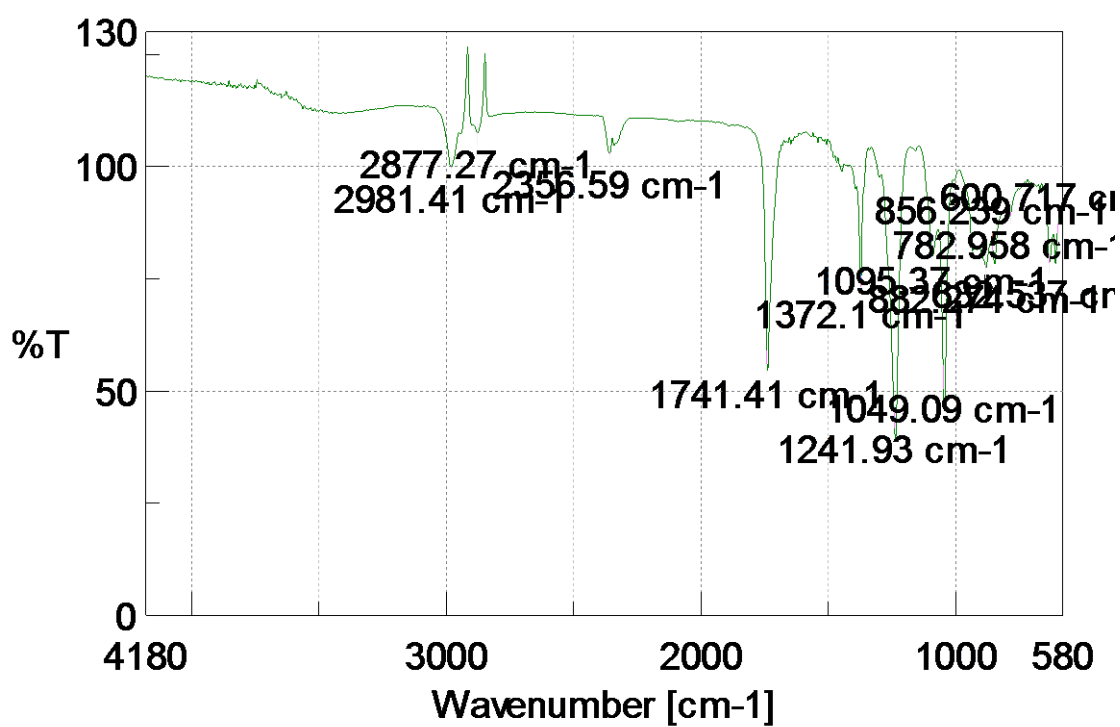
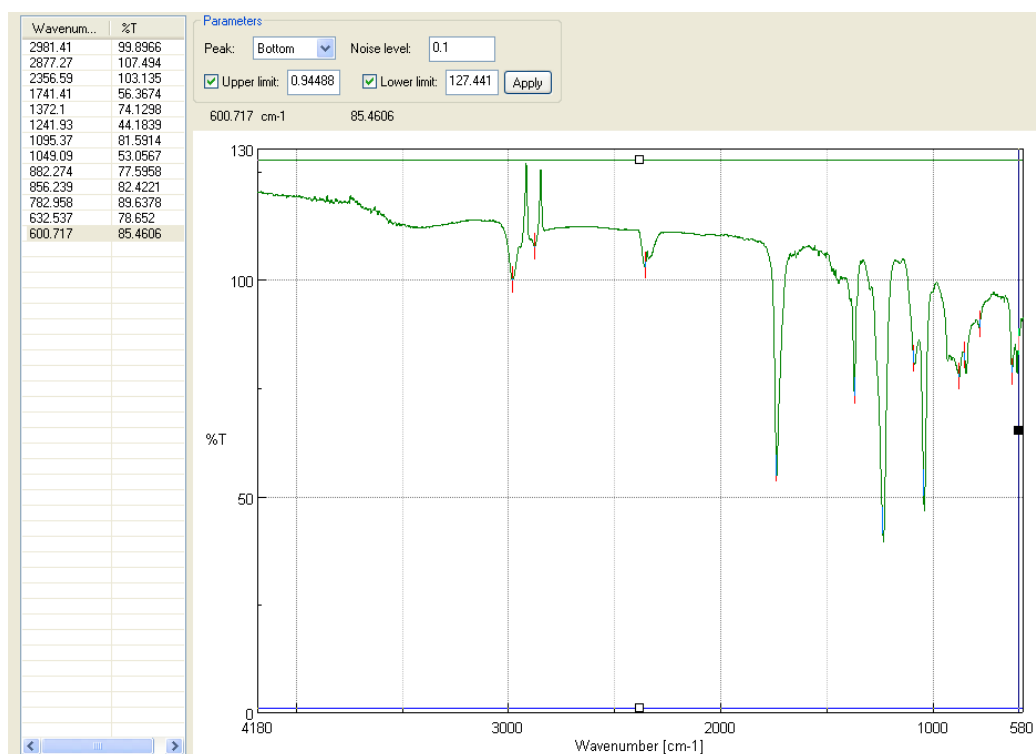
FRACCIÓN 16



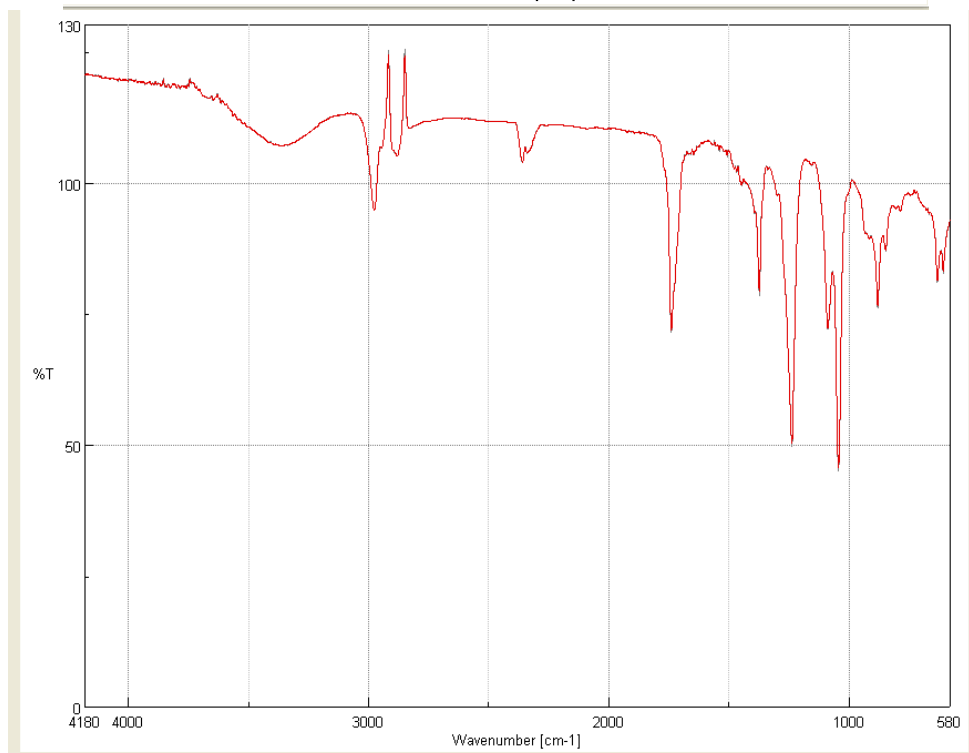
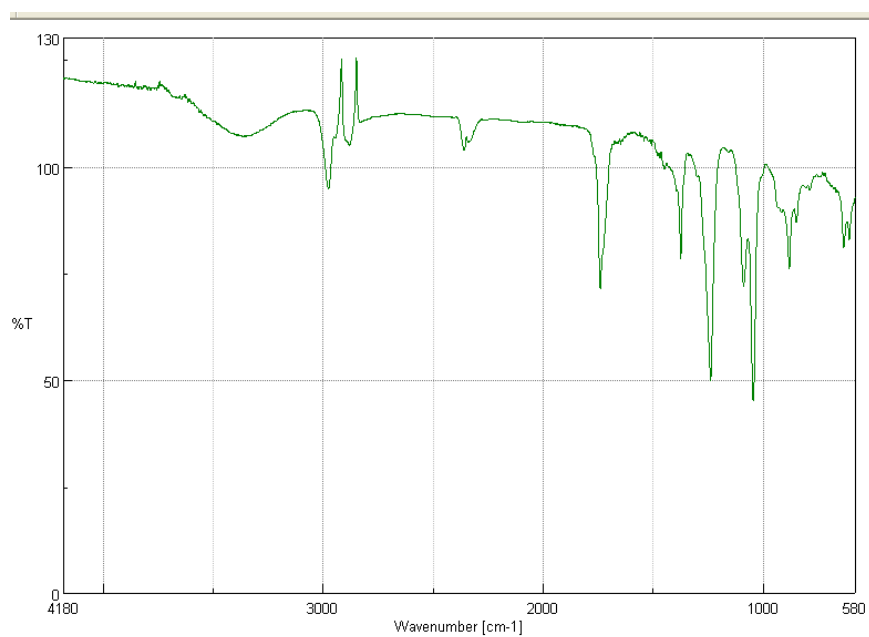


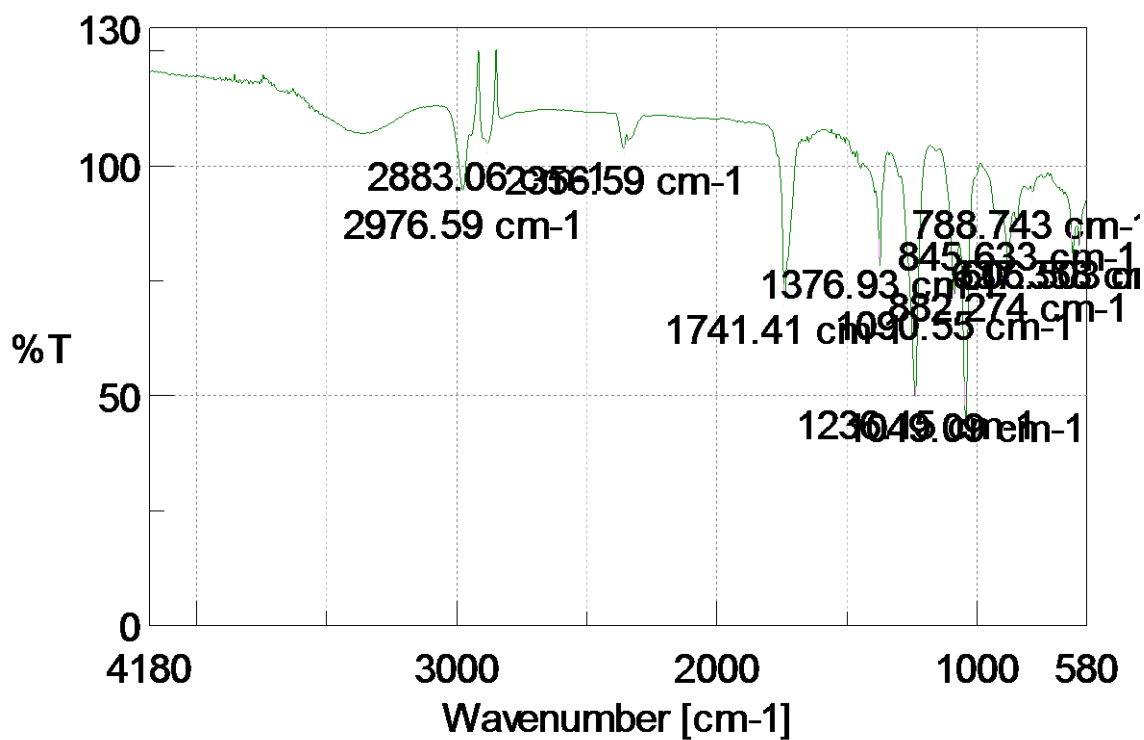
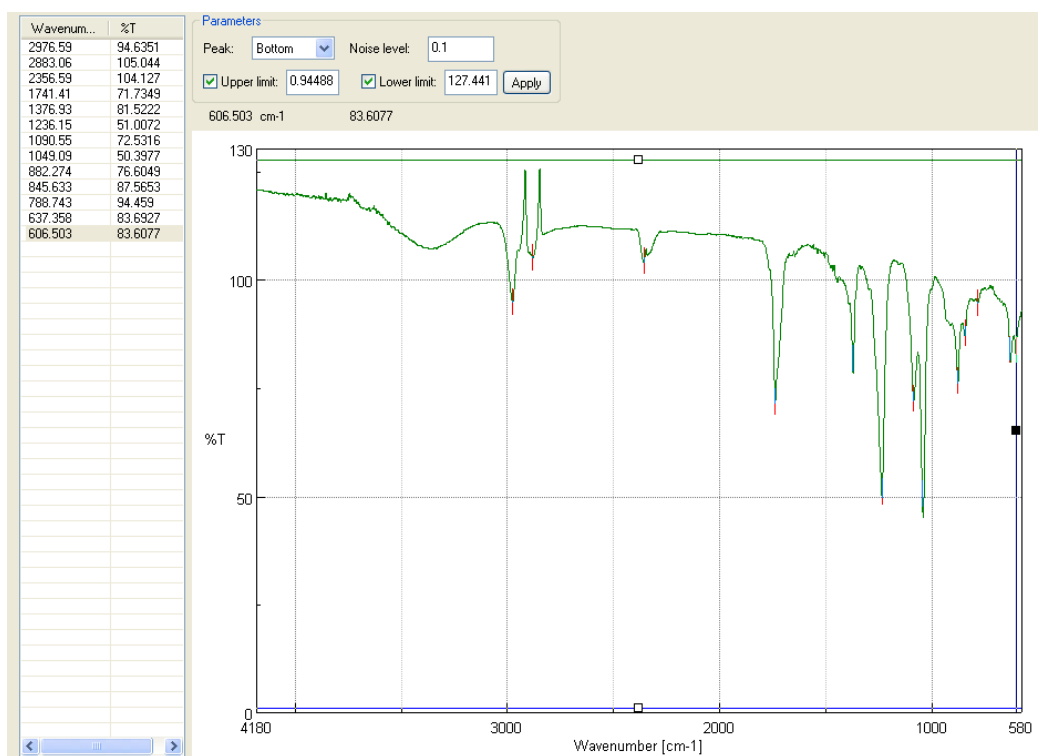
FRACCIÓN 6

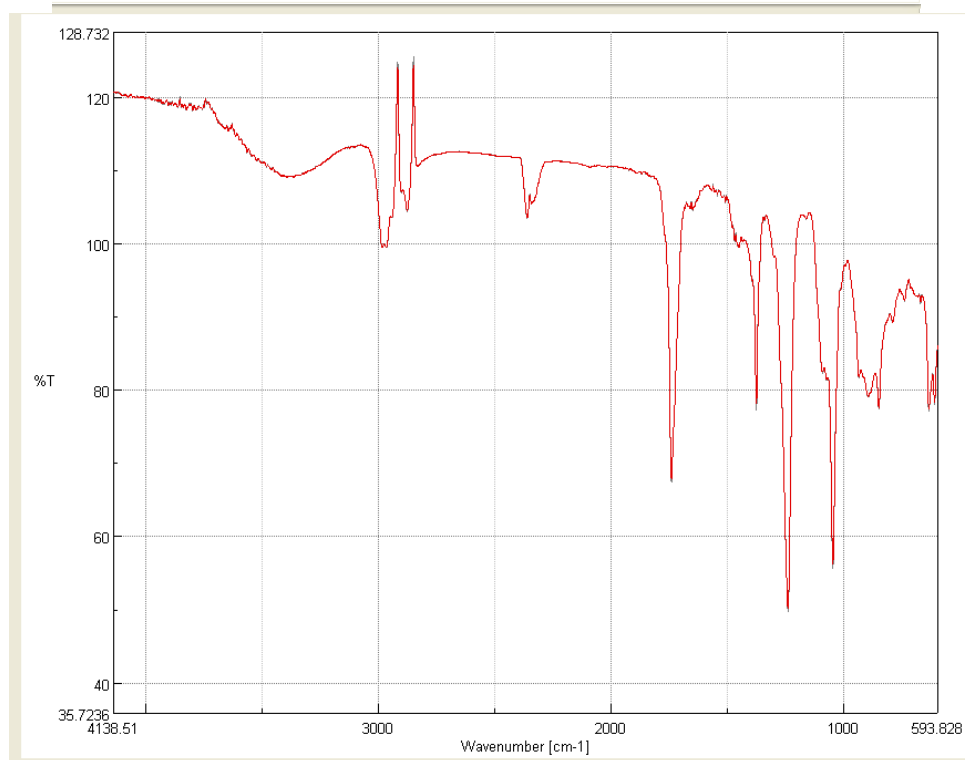
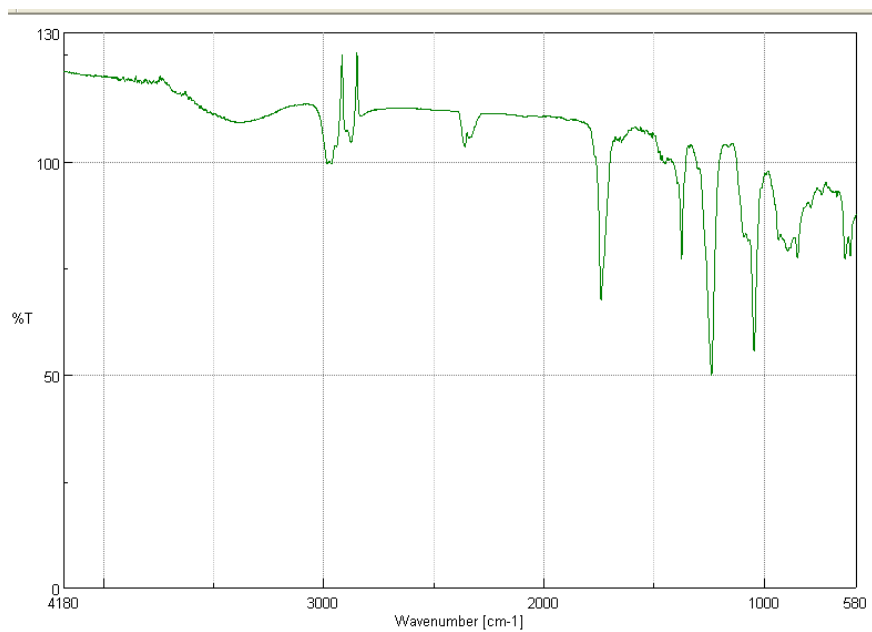


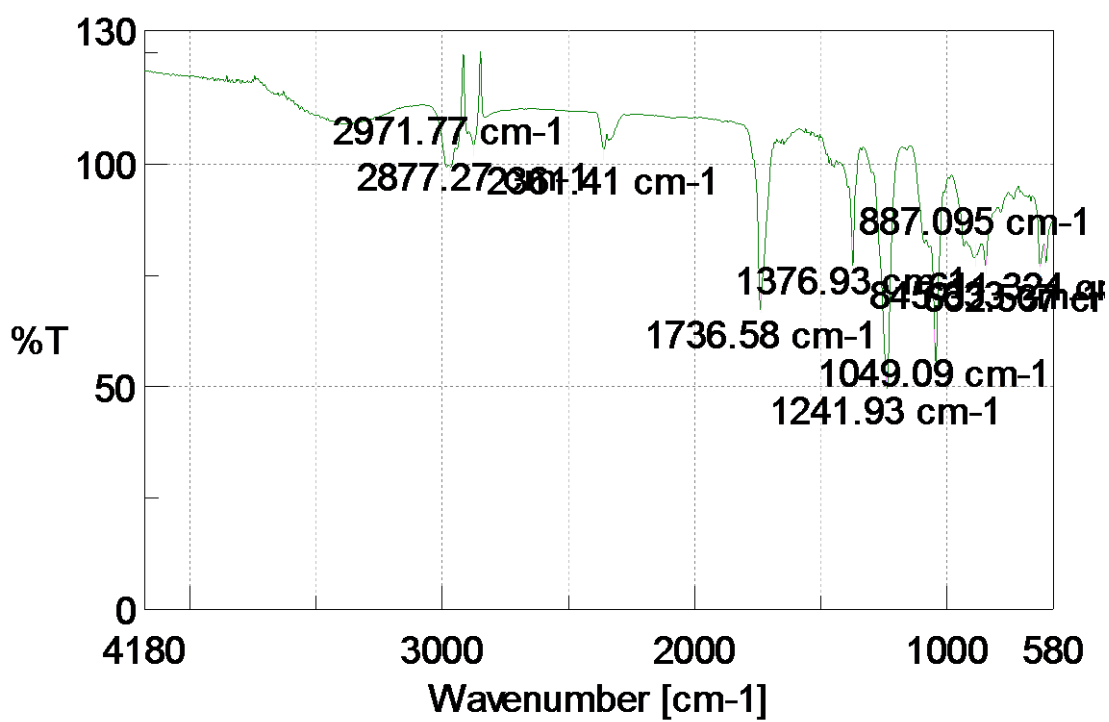
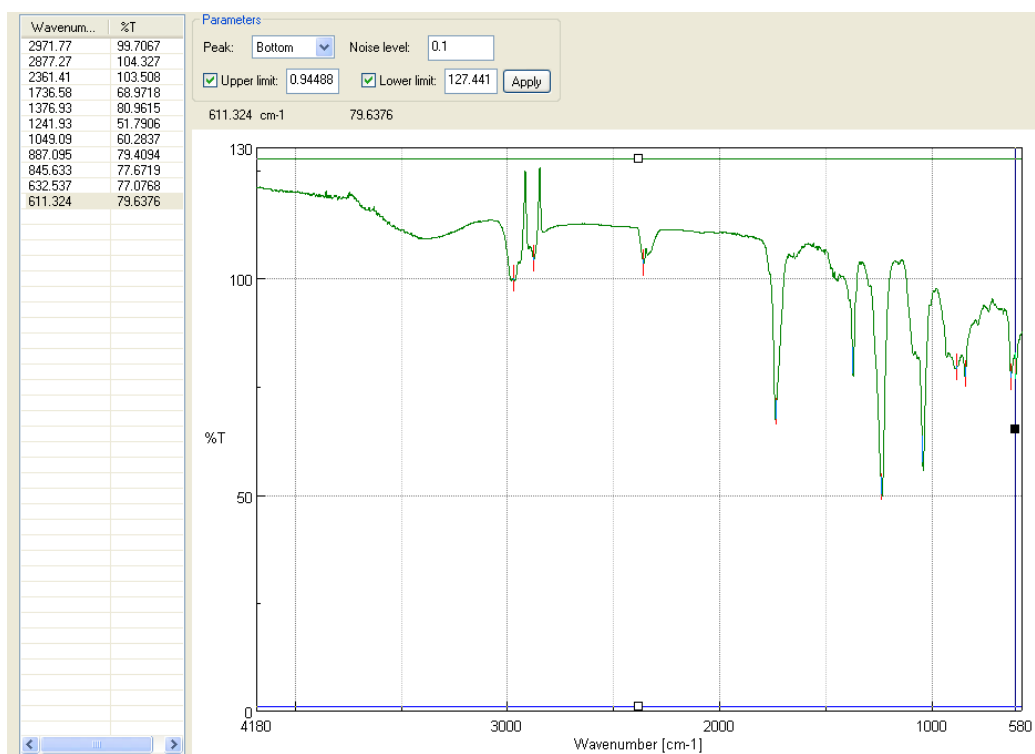


FRACCIÓN 3,4 y 5









POSIBLE TERPENO

FRACCIÓN 4C2

